

⑯ 公開特許公報 (A) 昭62-272988

⑮ Int. Cl.
C 12 P 21/00
C 12 N 1/14
15/00

識別記号

府内整理番号

⑯ 公開 昭和62年(1987)11月27日

6712-4B
D-6712-4B
7115-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全33頁)

⑯ 発明の名称 アスペルギルス オリザにおけるタンパク生成物の製造法

⑯ 特 願 昭62-60276

⑯ 出 願 昭62(1987)3月17日

優先権主張

⑯ 1986年3月17日 ⑯ デンマーク(DK) ⑯ 1226/86

⑯ 発明者	エスパー ボエル	デンマーク国, 2840 ホルテ, リュングバゲベイ 25
⑯ 発明者	トベー クリストンセ	デンマーク国, 2800 リュンクビュ, 1. テーホー, ボーレバーデン 10
⑯ 発明者	ヘレ フアブリシウス	デンマーク国, 3540 リュンゲ, ステンデユツセベイ 12
	ウォルデケ	
⑯ 出願人	ノボ インダストリ	デンマーク国, 2880 バグスバエルト, ノボ アレ (番地
	アクティーゼルスカブ	なし)
⑯ 代理人	弁理士 青木 朗	外4名

明細書の添書(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称

アスペルギルス オリザにおけるタンパク
生成物の製造法

2. 特許請求の範囲

1. アスペルギルス オリザ (*Aspergillus oryzae*) におけるタンパク生成物の発現方法であ
って、

(a) アスペルギルス オリザ (*Aspergillus oryzae*) 宿主のゲノム中に1個以上のコピーを組
込み可能であり且つ遺伝子発現を促進する機能を暗号化するDNA配列と、形質転換細胞の選択に
好適なマーカーと、所望なタンパク生成物を暗号化するDNA配列とを有する組換えDNAクローニ
ングベクター系を提供し、

(b) 選定された選択マーカー用の機能遺伝子を
有しないアスペルギルス オリザ (*Aspergillus oryzae*) を工程(a)からの組換えDNAクローニ
ングベクター系で形質転換し、次いで

(c) 形質転換したアスペルギルス オリザ

(*Aspergillus oryzae*)宿主を適当な培養基中で培
養する工程から成る方法。

2. 遺伝子発現を促進する機能を暗号化する
DNA配列が、プロモーターと、転写開始部位と、
転写ターミネーターおよびポリアデニル化機能を
有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. プロモーターに対して、上流活性化配列が
先行する、特許請求の範囲第2項記載の方法。

4. 選択マーカーが、*A. nidulans* または *A. niger* (*argB*)、*A. nidulans* (*nidulans*) *trpC*、*A. nidulans* (*nidulans*) *endS*、ニューロスボラ クラザーエ (*Neurospora crassa*) *Pyr4* または DHFR から誘導される、特
許請求の範囲第1項記載の方法。

5. 選択マーカーが *A. nidulans* または *A. niger* から誘導される *ArgB* 遺
伝子または *A. nidulans* から誘導される *endS* 遺
伝子である、特許請求の範囲第4項記
載の方法。

6. プロモーターおよび上流活性化配列がアミ

ラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リバーゼ、セルラーゼまたは解糖酵素のような細胞外あるいは細胞内タンパクを暗号化する遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第3項記載の方法。

7. プロモーターおよび上流活性化配列が、A. オリザ(oryzae) TAKAアミラーゼ、リゾムコールマイヘイ(Rhizomucor miehei) アスパラギン酸プロテナーゼ、A. ニガー(niger) 中性α-アミラーゼ、A. ニガー(niger) グルコアミラーゼまたはリゾムコールマイヘイ(Rhizomucor miehei) リバーゼについての遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第6項記載の方法。

8. プロモーターがA.oryzae TAKAアミラーゼプロモーターまたはその機能性部分である、特許請求の範囲第7項記載の方法。

9. プロモーターおよび上流活性化配列が以下の配列

GTGACCC ATTCCGAATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA
CATACCCCTC CGGGTACTAC ACCGACCGAC CGAGCCACTT
CAGCCCTAA AACCCCTTAT ACAATTAAAGC ACTTAAAGAA

AATCACAGTC CTCCCCGCTA TTGTCCTCCA CAATGCAATT
TAAACTCTTC TGGCAATCCC TTGGATTCCC CGGGCCCTACT
CGTAGACCTT AAAGTATCTC CTTTGTGGAT CGGATGTATC
ACAACATATA AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGC
ATAGCAACCG ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG
AACAAATAAC CCCACAC

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する、特許請求の範囲第8項記載の方法。

10. プロモーターおよび上流活性化配列が以下の配列

AGATCTGCC TTATAATCT CCTAGTCTGA TCGTCGACGC
ATTCCGAATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA CATACCCCTC
CGGGTACTAC ACCGACCGAC CGAGCCACTT CAGCCCTAA
AACCCCTTAT ACAATTAAAGC ACTTAAAGAA GTTACAATCT
ACGCTTAAA AGCTACTTAA AAATGCAATCT CGCAGTCCCC
ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAAATCAAC TCATTAAGG
TGGCAACGA CCTATAAAATG ATATAACAAAT ATAAACCAT
TAATTAGAGC AATATCAGGC CGGGCACCA AGCCAACTTA
AAAACCGAAA CGCCCTACT AACACAGATTA CTTTGAAAAA

GTAGAAATCT ACGCTTAAAC ACCTACTTAA AAATGCAATCT
CCGAGCTCCG ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAAATCAAC
TCATTAAGG TGCCGAACCA CCTATAAAATG ATATAACAAAT
ATAAACCAT TAATTAGAGC AATATCAGGC CGGGCACCA
AGCCAACTTA AAAACCGAAA CGCCCTACT AACACAGATTA
CTTTGAAAAA AGCCACATCA GTATTTAAAG CCCCAATCT
TATTAACCCG CGAAATCAGG CACATAAAAC CATAACAGCA
CATAGACCTC TACCTATTAA ATCCGCTCT AGGGGGGCTC
CATCTAAATG TTCTGGCTCT CGTGTACAGG CGCATAAAAT
TACGGCACTAC CGGAATCGAT ACAACTACTC ATTTTATAT
AGAAGTCAGA ATTCACTAGC TTTGATCAT TTTAAATTTT
TATATGGCCG GTGGTGGGCA ACTCCGTTGC CGGGGCAACT
CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACCTGAAAT
CGTCAGGCA TCCAAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCCCGAAG
TCAACAGCAT CCAAGCCCCA GTCCCTCAGG GAGAAACCCC
AGCGTCCACA TCACCGAGCGA AGGACCCACT CTAGGCATCG
GACGCACCAT CCAATTAGAA GCACCAAAGC GAAACACCCC
AAGAAAAAGG TCGGGCCGTC GGCCTTTCT CGAACCGCTGA
TCACGGGCAAG CGATCCAACC AACACCCCTCC AGACTGACTA
GGGGGGGAAA TTTAAAGGGA TTAATTCCA CTCAACCACA AACACACACTC

AGCCACATCA GTATTTAAAG CCCCAATCT TATTAACCCG
CGAAATCAGG CACATAAAAC CATAACAGCA CATAGACCTC
TACCTATTAA ATCCGCTCT AGGGGGGCTC CATCTAAATG
TTCTGGCTCT CGTGTACAGG CGCATAAAAT TACCCACTAC
CGGAATCGAT ACAACTACTC ATTTTATAT AGAAGTCAGA
ATTCACTAGC TTTGATCAT TTTAAATTT TATATGGCCG
GTGGTGGGCA ACTCCGTTGC CGGGGCAACT CGCTTACCGA
TTACGTTAGG GCTGATATTT ACCTGAAAT CGTCAGGGA
TCCAAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCCCGAAG TCAACAGCAT
CCAAGCCCCA GTCCCTCAGG GAGAAACCCC AGCGTCCACA
TCACCGAGCGA AGGACCCACT CTAGGCATCG GACGCACCAT
CCAATTAGAA GCACCAAAGC GAAACACCCC AACAAAAAGC
TCGGGGCCGTC GGCCTTTCT CGAACCCCTGA TCACGGGCAAG
CGATCCAACC AACACCCCTCC AGACTGACTA GGGGGGGAAA
TTTAAAGGGA TTAATTCCA CTCAACCACA AACACACACTC
GTCCCCGGTA TTCTCCGCA GAATGCAATT TAAACTCTTC
TCCGAATCGC TTGGATTCCC CGCCCTACT CGTAGAGCTT
AAAGTATGTC CCTTGTGAGT CGGATGTATC ACAACATATA
AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGG ATAGCAACCG
ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG AACAAATAAC

CCACACAGAAC GCATT

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する、特許請求の範囲第8項記載の方法。

11. 特許請求の範囲第10項記載の配列に対して、プラスミドTAKA 17における位置0~1.05の1.05kb無配列上流領域が先行する、特許請求の範囲第10項記載の方法。

12. ベクター系が更に培養基に発現した生成物の分泌に備えたプレ領域を有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

13. プレ領域がアスペルギルス(*Aspergillus*)種からのグルコアミラーゼあるいはアミラーゼ遺伝子、バシラス(*Bacillus*)種からのアミラーゼ遺伝子、リゾムコールマイペイ(*Rhizomucor miehei*)からのリバーゼあるいはプロテイナーゼ遺伝子、*S. cerevisiae*からのα-因子の遺伝子または仔牛のプロキモシン遺伝子から誘導される、特許請求の範囲12項記載の方法。

14. プレ領域がA. オリザ(*oryzae*) TAKAアミ

ラーゼ、A. ニガ-(*niger*)中性α-アミラーゼ、A. ニガ-(*niger*)の酸に安定なα-アミラーゼ、B. リケニフォルミス(*licheniformis*)、α-アミラーゼ、バシラス(*Bacillus*) NCIB 11837マルトース原性アミラーゼ、B. ステロサーフィラス(*stearothermophilus*) α-アミラーゼまたはB. リケニホルミス ズブチリシン(*licheniformis subtilisin*)の遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第13項記載の方法。

15. プレ領域が以下の配列

ATGATGCTGCCGCTGCTCTCTATTCTGTACGCCCTTCAG
Met Met Val Ala Trp Trp Ser Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Glu

CTCGGGGACCTGCTTTGGCT
Val Ala Ala Pro Ala Leu Ala

を有するTAKA-アミラーゼプレ領域である、特許請求の範囲第14項記載の方法。

16. ベクター系が2個のベクターから成り、一方が選択マーカーを有し、他方は遺伝子発現を促進する機能を暗号化するDNA配列と所望なタン

パク生成物を暗号化するDNA配列を有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

17. アスペルギルス オリザ(*Aspergillus oryzae*)におけるタンパク生成物の產生法であり、特許請求の範囲第1項記載の組換えDNAクローニングベクター系で形質転換されるアスペルギルス オリザ(*Aspergillus oryzae*)株を適當な培養基で培養して、生成物を培養基から回収する方法。

18. アスペルギルス(*Aspergillus*)におけるタンパク生成物の発現に好適なプロモーターであって、TAKA-アミラーゼプロモーターまたは上流活性化配列が任意に先行する上記プロモーターの機能的部分であることを特徴とするプロモーター。

19. 以下の配列

AGATCTCCCC TTATAAAATCT CCTAGTCTGA TCGTCGACCC
ATTCCCCATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA CATAACCCCTC
CCCTCTACTAG ACCCGAGCAGC CGAGCCAGTT CAGCCCTAA
AACGCCCTAT ACAATTAAACG ACTTAAAGAA GTTAAATCT
ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCCATCT CCCAGTCCCC
ATTCCGCTAT CAAACCCACT TTAATCAAC TGATTAAAGG

TGCCGAACCA GCTATAAAATC ATATAACAAAT ATTAAGCAT
TAATTAGACG AATATCAGCC CGCGCACGAA AGGCAACTTA
AAAAACGAAA CGCCTCTACT AAACAGATTA CTTTTGAAAA
AGCCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT TATTAAGCCC
CGAAATCAGG CAGATAAAAGC CATAACGGCA GATAACACCTC
TACCTTAAAT ATCGGCTTCT AGGGCCGCTC CATCTAAATC
TTCTGGCTGT GGTGTACAGG GGCATAAAAT TACCCACTAC
CCGAATCCAT AGAACTACTC ATTTTTATAT AGAAACTCAGA
ATTCTATAGTG TTTTGATCAT TTTAAATTTT TATATGGCCC
GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC CGGGGCAACT CGCTTACCGA
TTACGTTAGG GCTCATATTI ACCTGAAAT CGTCAACCGCA
TCCAAGACCA AAGTACTAAA ACCCCCCGAAG TCAACACGCA
CCAAGCCCCA GTCCCTCAGG GAGAAACCCC AGCCCTCCACA
TCACCGAGCGA AGGACCACT CTAGGCATCG GACCCACCAT
CCAATTAGAA CGACCAAACG GAAACAGCCC AAGAAAAACG
TCCGGCCCGTC CGCCCTTTCT CGAACGCTGA TCACCGGCAG
CGATCCAACC AACACCCCTCC AGAGTGACTA GGGGGGGAAA
TTTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCAACCCACA AATCACAGTC
CTCCCCGGTA TTGCTCTCCA GAATGCAATT TAAACTCTTC
TCCGAATCGC TTGGATTCCC CGCCCTACTGT CGTAGAGCTT

AAAGTATGTC CCTTGTGAT CCCATGTATC ACAACATATA
AATACTACCA AGGGATGCCA TCCTTGGAGG ATACCAACCC
ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG AACATAAAC
CCCACAGAG GCATT

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する特許請求の範囲第18項記載のプロモーターおよび上流活性化配列。

20. 上流活性化配列に対して、プラスミドpTAKA 17における位置0～1.05の1.05kb無配列上流領域が先行する、特許請求の範囲第19項記載のプロモーターおよび上流活性化配列。

21. 以下の配列

GTCGACGC ATTCCCCATA CGACCCCTGA TTAATGATTA
CATACGCCCTC CGGGTACTAG ACCGGAGCAGC CGAGCCAGTT
CAGCCCTAA AACCCCTTAT ACAATTAAAC AGTTAAAGAA
GTTAGAATCT ACCCTTAAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT
CGCAGTCCCC ATTCCGCTAT CAAACCCAGT TTAATCAAC
TGATTAAGG TGCCGAACCA CCTATAAATG ATATAACAAT
ATTAAACCAT TAATTAGAGC AATATCAGGC CGGGCACGAA

ATAGCAACCG ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG
AACATAAAC CCCACAG

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する特許請求の範囲第19項記載のプロモーターおよび上流活性化配列。

3. 発明の詳細な説明

〔発明の技術分野〕

本発明はアスペルギルス オリザ(*Aspergillus oryzae*)におけるタンパク生成物の発現法、組換えDNAベクター、アスペルギルス(*Aspergillus*)用プロモーターおよび形質転換された菌類に関する。

〔従来の技術〕

今日までに、組換えDNA技術によるポリペプチドまたはタンパクを生産するため数多くの方法が開発されてきた。主な興味は細菌および酵母に集中されてきたのであり、例えばE. coli、Bacillus subtilis およびSaccharomyces cerevisiae

AGCCAACCTTA AAAACCGAAA CGCCTCTACT AAAACAGATTA
CTTTTCAAAA AGGCACATCA CTATTTAAAG CCCGAATCCT
TATTAAGCGC CGAAATCAGG CAGATAAAGC CATAACAGGC
CATAGACCTC TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGGGCCGCTC
CATCTAAATG TTCTGGCTGT GGTGTACAGG CCCATAAAAT
TACCCACTAC CGGAATCGAT AGAACTACTC ATTTTTATAT
AGAAGTCAGA ATTCTATAGTC TTTGATCAT TTTAAATTTT
TATATGGCCC CTGCTCGGCA ACTCCCTTGC CGGGCCAACT
CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACCTGAAAAT
CGTCAAGGCA TCCAACACCA AAGTACTAAA ACCCCCCGAAC
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCCCTCAGG CAGAAACCCC
AGCCGTCACCA TCACCGACCA AGGACCACCT CTAGGCATCG
GACCCACCAT CCAATTAGAA CGACGAAAGC CAAACAGCCC
AAGAAAAAGG TCGGCCCCGTC GGCCTTTCT CCAACCCCTGA
TCACGGGCAC CGATCCAACC AACACCCCTCC AGACTGACTA
GGGGCGGAAA TTTAAAGGGA TTAATTCCA CTCAACCACAA
AATCACAGTC GTCCCCCGTA TTGCTCTGCA GAATGCAATT
TAAACTCTTC TCCGAATCCC TTGGATTCCC CGCCCCCTAGT
CGTAGACCTT AAAGTATGTC CCTTGTGAT CGCATGTATC
ACAACATATA AATACTACCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGC

viziaeは例えば発現および選択系に関して詳細に特徴化されているものである。

上記の微生物のほかに、*Aspergillus niger* のような糸状菌は、詳細に特徴化されている組換えDNAベクター用の宿主微生物として有望な候補であり、酵素を商業的に生産するのに広範囲に用いられている微生物である。形質転換された宿主微生物から形質転換細胞を選択できる選択マーカーが用いられる形質転換系の開発に、特に努力が集中してきた。

過去数年間に*Aspergillus nidulans*の形質転換のための各種選択マーカーが報告され、菌の細胞分化を制御する遺伝学的および分子学的方法を研究する目的で糸状菌*Aspergillus nidulans*の組込み形質転換の手法が近年になり開発してきた。

A. nidulans の形質転換は、*Neurospora crassa* pyr-4 遺伝子 (Bellance, D.J. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 第 112巻, (1983年), 284～289頁)、*A. nidulans* amdS 遺伝子 (Tilburn, J.G. ら, Gene, 第 26巻, (1983年), 205～221頁)、

A. nidulans *trpC*遺伝子(Yelton, M.M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 第81巻、(1984年)、1470~1474頁)および*A. nidulans* *argB*遺伝子(John, H.A.およびPeberdy, J.; Microb. Technol., 第6巻、(1984年) 386~389頁)を含むプラスミドを用いて説明されてきた。形質転換するDNAは、比較的低い頻度(典型的には1000個未満の形質転換体/1 μgのDNA)で宿主ゲノムに組込まれることが分かった。

ごく最近に、*A. nidulans*の*endS*遺伝子を用いる*Aspergillus niger*の形質転換が報告され(Kelly, J.H.とHynes, M.J.; EMBO Journal, 第4巻、(1985年)、475~479頁)、*endS*は単一の窒素源としてのアセタミド上では強力には成長できない*Aspergillus niger*の形質転換に使用される有力な選択マーカーであることが示された。*A. nidulans*の*argB*遺伝子を用いる*Aspergillus niger*の形質転換も、最近報告された(Buxton, F.P.ら、Gene, 第37巻、(1985年)、207~214頁)。

以下余白

の形質転換に用いたマーカー遺伝子を使用することによって、所望なタンパク生成物を暗号化するDNAで形質転換した*A. oryzae*株の選択が可能である。これら前者の菌類と*A. oryzae*との系統発生的距離(Raper, K.B.およびFennell, D.I.; (1985年)The Genus *Aspergillus*)のために、これにはまったく予知されないものであった。

本発明の第一の見地によれば、

(a) アスペルギルス オリザ(*Aspergillus oryzae*)宿主のゲノム中に1個以上のコピーを組込み可能であり且つ遺伝子発現を促進する機能を暗号化するDNA配列と、形質転換細胞の選択に好適なマーカーと、所望なタンパク生成物を暗号化するDNA配列とを有する組換えDNAクローニングベクター系を提供し、

(b) 選定された選択マーカー用の機能遺伝子を有しない*Aspergillus oryzae*を工程(a)からの組換えDNAクローニングベクター系で形質転換し、次いで

(c) 形質転換した*Aspergillus oryzae*宿主を適

〔発明が解決しようとする同題点〕

糸状菌*Aspergillus oryzae*における異種タンパクの発現のための系は、主として、この菌における遺伝子発現の制御法が十分には知られておらず且つクローニングベクター上に好適な選択可能な遺伝子マーカーが欠如していることにより、これまで開発されなかった。

〔同題点を解決するための手段、発明の作用および効果〕

本発明によれば、上記の形質転換技法を用いて、異種タンパクを高濃度で発現させまたは*Aspergillus oryzae*における同種タンパクの産生を増進させることができる。

本明細書において用いられる「異種タンパク」という表現は*A. oryzae*によっては産生されないタンパクを意味し、一方「同種タンパク」という表現は*A. oryzae*自体によって産生されるタンパクを意味する。

更に具体的には、*A. niger*および*A. nidulans*

当な培養基中で培養する工程から成る*Aspergillus oryzae*においてタンパク生成物の発現法が提供される。

本発明の第二の見地によれば、*Aspergillus*、具体的には*Aspergillus oryzae*および*Aspergillus niger*におけるタンパク生成物の発現に極めて効果的なプロモーターであって、TAKA-アミラーゼプロモーターまたは任意に上流活性化配列が先行する上記プロモーターの機能的部分として特徴化されるものが提供される。

本発明の第三の見地によれば、*Aspergillus oryzae*におけるタンパク生成物の産生法であって、上記のように組換えDNAクローニングベクターを用いて形質転換した*Aspergillus oryzae*株を適当な培養基中で培養し、生成物を培養基から回収する方法が提供される。

使用した形質転換法は、*A. nidulans*の形質転換法の変法(Ballance, D.J.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 第112巻、(1983年)、284~289頁、Tilburn, J.G.ら、Gene, 第26巻、(1983年)、

205~221頁)、Yelton, M.H.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、第81巻、(1984年)、1470~1474頁)およびA. nigerの形質転換についてのBuxtonらの方法、(Gese、第37巻、(1985年)、207~214頁)に類似の方法であった。本発明の方法では、Aspergillus oryzaeは、宿主株のゲノム中に組込むことができるが、形質転換前は宿主株に有しない選択マーカーを含むベクター系で形質転換される。

好みい選択マーカーは *argB* (*A. nidulans* または *A. niger*)、*trpC* (*A. nidulans*)、*amdS* (*A. nidulans*) または *syr4* (*Neurospora crassa*) 遺伝子、または *DHFR* (ジヒドロフォレートレダクターゼまたはその変異株) 遺伝子である。更に好みい選択マーカーは *argB* または *araS* 遺伝子である。野生型 *A. oryzae* 株は通常は *argB*⁺ である (すなわち、*argB* 遺伝子が *A. oryzae* において機能的である)。*argB* を選択マーカーとして選択する場合には、このマーカーに対して遺伝子に欠損を有する *A. oryzae* の *argB* 変異株を宿主株として用いなければ

一ゼ、Rhizomucor miehei アスパラギン酸プロテイナーゼ、A. niger グルコアミラーゼ、A. niger 中性α-アミラーゼ、A. niger 酸安定α-アミラーゼおよびRhizomucor miehei リバーゼについての遺伝子から誇導することができる。解糖酵素の遺伝子からのプロモーターの例は、TPI、ADH および PGK である。

本発明による好ましいプロモーターは、*T. oryzae* TAKA-アミラーゼプロモーターである。TAKAアミラーゼは周知の α -アミラーゼ(Todaら、Proc. Japan Acad.、第58巻、シリーズB(1982年)、208~212頁)である。プロモーター領域を暗号化するDNAは、TAKA-アミラーゼゲノム性クローンから誘導した。プロモーターおよびプロモーターの上流の領域の配列を、プレ領域およびTAKA-アミラーゼについての精造遺伝子の5'末端と共に第1図に示す。

実施例2に更に詳細に説明されるように、アレル領域およびプロモーターおよび上流活性化配列を含むTAKA-アミラーゼを暗号化するDNA配列は、

ならない。*A. oryzae*のargB変異株はF.P. Buxtonらが報告したのと同様にして調製することができる(Gene、第37巻、(1985年)、207~214頁)。argB変異株はオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子に欠損を有する変異株として定義される。他方、aadS遺伝子は、野生型*A. oryzae*株がこの遺伝子を含まないので、この野生株の形質転換の選択マーカーとして用いることができる。

遺伝子配列を促進する機能を暗号化するDNA配列は、典型的にはプロモーター、転写ターミネーターおよびポリアデニル化シグナルである。

当業界において周知のように上流活性化配列およびエンハンサー配列が先行することのあるプロモーターは *Aspergillus oryzae* において強力な転写活性を示すことができる如何なる DNA 配列であってもよく、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リバーゼ、セルラーゼおよび解糖酵素のような細胞外および細胞内タンパクのいずれをも暗号化する遺伝子から構成することができる。好適なプロモーターは *A. oryzae* TAKAアミラーゼ

A. oryzae mycelium から誘導され、*Bam*HI を消化した pBR322 に挿入されて、アラスミ pTAKA 17 を生成した(第 2 図を参照されたい)。pTAKA 17 *A. oryzae* から誘導された DNA は 5.5 kb *Bam*HI / *Sau* 3AI-*Bam*HI / *Sau* 3AI フラグメントとして示され、プロモーターおよび上流活性化配列は位置 0 で開始する 2.1 kb フラグメントを表わす。*Bgl*II 部位までのプロモーターおよび上流活性化配列の確立された DNA 配列を、第 1 図に示す。プロモーターは、TAKA-アミラーゼアレ配列の *Met*(1) コドンに先行するヌクレオチド-1 で終了する。アレ配列を暗号化するヌクレオチド配列は 63 個のヌクレオチドから構成され、成熟 TAKA-アミラーゼはヌクレオチド 64 に対応する位置から開始する。

¶TAKA 17から、プロモーターに対して上流の配列を含む全プロモーター配列またはその機能的部分は、当著者に公知の手段によって誘導することができる。プロモーター配列は、プロモーター配列を、例えば所望なタンパク生成物またはことな

るプレ領域(シグナルペプチド)を暗号化する遺伝子のような他のDNAとの連結を促進する特異的な制限部位を導入するために、リンカーを備えていてもよい。

本発明による方法では、(Sal I部位の開始を表わす)ヌクレオチド-1144(第1図を参照されたい)からヌクレオチド-10の配列を、プロモーター領域の十分に機能する部分の一例として使用した。本発明のもう一つの態様では、ヌクレオチド-1176から-1までのヌクレオチド配列は、pTAKA 17からの未だ配列されていない1.05kbフラグメントが先行した。各種のフラグメントを使用できることは、当業者にとって明らかである。

本発明の一態様によれば、プロモーターおよび上流活性化配列は、第1図におけるヌクレオチド-1144からヌクレオチド-10の配列を表わす下記の配列または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する。

以下余白

```

AAGAAAAAAGC TCGGCCCCGTC CGCCTTTTCT GCAACGCTGA
TCACGGCCAG CGATCCAACC AACACCCCTCC AGACTGACTA
GGGGGGGAAA TTAAAGGGA TTAAATTTCCA CTCAAACCCACA
AAATCACACTC GTCCCCGGTA TTCTCCTGCA GAATGCAATT
TAAACTCTTC TGGGAATCCC TTGGATTCCC CGCCCTCTAGT
CGTAGAGCTT AAAGTATGTC CCTCTCTCGAT CCCATGCTATC
ACAACATATA AAATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGC
ATAGCAACCC ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTCTCTC
AACATAAAAC CCCACAG

```

もう一つの態様によれば、プロモーターおよび上流活性化配列は、第1図におけるヌクレオチド-1176から-1までの配列を表わす下記の配列または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する。

```

AGATCTCCCC TTATAAATCT CCTAGCTGCA TCGTCCACCC
ATTCCAAATA CGACGCCCTGA TTAAATGATTA CATAACCCCTC
CGGGTAGTAG ACCCACCCAGC CGAGCCAGTT CAGCCCTAA
AACCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA TTAGAATCT
ACGCTTAAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT CCCAGTCCCC

```

```

CTCGACCC ATTCCGAATA CGAGCCCTGA TTAATGATTA
CATACCCCTC CGGGTAGTAG ACCCACCCAGC CGAGCCAGTT
CAGCCCTTAA AACCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA
TTAGAATCT ACGCTTAAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT
CCCAGTCCCC ATTCCCTAT CAAACCCAGT TTAAATCAAC
TGATTAAAGG TCGCCGAACCA CCTATAAATC ATATAACAAT
ATTAAAGCAT TAATTAGAGC AAATATCAGCC CGCCGACCGAA
AGGCAACTTA AAAAGCCAAA CGCCCTCTACT AAACACGATTA
CTTTGAAAAA AGGCACATCA GTATTTAAAG CGCGAATCCT
TATTAAGCCC CGAAATCAGG CAGATAAAAGC CATAACAGGCA
GATAGACCTC TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGGGGGGCTC
CATCTAAATC TTCTGGCTGT GGTGTACAGG GCCATAAAAT
TACGCACTAC CGGAATCGAT AGAACTACTC ATTTTATAT
AGAAGTCACA ATTCACTAGT TTTGATCAT TTTAAATTTT
TATATGGCCC CTGGTGGCCA ACTCGCTTGC CGGGGGCAACT
CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACCTGAAAAAT
CGTCAGGCA TCCAAGACCA AACTAGTAAA ACCCCCCGAAAG
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCCCTTCAGG GAGAAACCCC
ACGGTCCACA TCACGAGGCA AGGACCCACCT CTACCCATCG
GACGCAACCAT CCAATTAGAA CGACCAAAGC GAAACAGCCC

```

```

ATTCCCTAT CAAACCCAGT TTAAATCAAC TGATTAAAGC
TGGCCGAACCA CCTATAAATC ATATAACAAT ATTAAAGCAT
TAATTAGAGC AAATATCAGCC CGCCGACCGAA AGGCAACTTA
AAAAGCCAAA CGCCCTCTACT AAACACGATTA CTTTGAAAAA
AGGCACATCA GTATTTAAAG CGCGAATCCT TATTAAGCCC
CGAAATCAGG CAGATAAAAGC CATAACAGGCA CATAACACCTC
TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGGGGGGCTC CATCTAAATC
TTCTGGCTGT GGTGTACAGG GCCATAAAAT TACGCACTAC
CGGAATCGAT AGAACTACTC ATTTTATAT AGAAGTCACA
ATTCACTAGT TTTGATCAT TTTAAATTTT TATATGGCCC
CTGGTGGGCC ACTCGCTTGC CGGGGGCAACT CGCTTACCGA
TTACGTTAGG GCTGATATTT ACCTGAAAAAT CGTCAGGCA
TCCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCCCGAAAG TCAACAGCAT
CCAAGCCCAA GTCCCTTCAGG GAGAAACCCC ACGGTCCACA
TCACGAGGCA AGGACCCACCT CTACCCATCG GACGCAACCAT
CCAATTAGAA CGACCAAAGC GAAACAGCCC AAGAAAGGAGC
TGGGGGGGCTC CGCCCTTTCT CGAACCCCTGA TCACGGGGCAG
CGATCCAACC AACACCCCTCC AGAGTGACTA GGGGGGGAAA
TTAAAGGGA TTAAATTTCCA CTCAAACCCACA AAATCACACTC
GTCCCCGGTA TTCTCCTGCA GAATGCAATT TAAACTCTTC

```

TCCGAATCCC TTGGATTCCC CGCCCCCTAGT CGTAGAGCTT
 AAAGTATGTC CCTTGTCGAT CCCATGATC ACAACATATA
 AATACTACCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGC ATAGCAACCC
 ACAACATCAC ATCAAAGCTCT CCCTTCTCTG AACAAATAAAC
 CCCACACAGG GCATTT.

本発明のもう一つの見地によれば、後者の配列では、TAKA 17からの1.05kb未配列の上流領域(第2図における位置0~1.05)が先行してもよい。

ターミネーターおよびポリアデニル化配列はプロモーターと同じ源から誘導することができる。エンハンサー配列を構造中に挿入してもよい。

発現した生成物は細胞の分裂を要する細胞内に蓄積させて、生成物を単離することができる。この付加的工程を回避し且つ細胞内で発現した生成物の可能な分解量を最少限にするには、生成物を細胞から分泌するのが好ましい。この目的のため、所望な生成物の遺伝子は、発現した生成物を細胞の分泌経路内への効果的に向けるプレ領域を有する。自然に起こるシグナルまたはリーダーベアチ

ドまたはその機能的部分あるいは分泌を行う合成配列であることができるこのプレ領域は、一般的には分泌の際に所望な生成物から開裂して、培養液から単離する準備のできた成熟生成物を残す。

このプレ領域は、如何なる有機物源からのものであっても分泌されるタンパクの遺伝子から誘導することができる。

本発明によれば、プレ領域はAspergillus種からのグルコアミラーゼまたはアミラーゼ遺伝子、Bacillus種からのアミラーゼ遺伝子、Rhizomucor mieheiからのリバーゼまたはプロテイナーゼ遺伝子、S. cerevisiaeからのα-因子の遺伝子または仔牛プロキモシン遺伝子から誘導することができる。更に好ましくは、プレ領域はA. oryzae TAKAアミラーゼ、A. niger中性α-アミラーゼ、A. niger酸安定α-アミラーゼ、B. licheniformis α-アミラーゼ、Bacillus NCIB 11837からのマルトース原性アミラーゼ、B. stearothermophilusまたはB. licheniformis subtilisinから誘導される。有効なシグナル配列は、A. oryzaeTAKA -

アミラーゼシグナル、Rhizomucor miehei アスパラギン酸プロテイナーゼシグナルおよびRhizomucor mieheiリバーゼシグナルである。

TAKA-アミラーゼシグナルは下記の配列を有する。

ATCATGGTGGCGTGGTGGTCTCTATTCTGTACGGCCCTTCAG
 MetMetValAlaTrpTrpSerLeuPheLeuTyrGlyLeuGlu

CTCGGGGGCACCTGCTTGGCT
 ValAlaAlaProAlaLeuAla

プロモーターおよびターミネーター配列に機能的に連結した所望な生成物の遺伝子は、選択マーカーを含むベクターに組込むことができ、または宿主株のゲノム中に組込むことができる別個のベクターまたはプラスミド上に置いててもよい。本明細書で用いる「ベクター系」という表現は単一ベクターまたはプラスミドまたは宿主ゲノム中に組込まれる全DNA情報を含む2種類以上のベクターまたはプラスミドを包含する。ベクターまたはプラスミドは、線状または閉じた円形分子であってもよい。本発明の好ましい態様によれば、A.

oryzaeは2個のベクターであって、一つは選択マーカーを含み、もう一つは宿主株に導入される残りの異種DNAから成り、プロモーター、所望な生成物および転写ターミネーターの遺伝子およびポリアデニル化配列を含むもので共形質転換される。

通常は、A. oryzae形質転換体は安定であり、選択マーカーの不在で培養することができる。形質転換体が不安定になる場合には、選択マーカーを用いて培養の際に選択してもよい。形質転換細胞を、次に問題のマーカーに対応する選択圧で培養する。

本発明はA. oryzaeにおいて多種多様なポリペプチドまたはタンパク生成物を高収率で製造する方法を提供する。A. oryzaeは長年にわたり例えばTAKA-アミラーゼ酵素およびタンパク分解酵素の生産に商業的規模で用いられてきており、従ってこの微生物の醸酵技術は十分に開発されており、この微生物は食品工業において使用されることが証明されている。本発明は、原則として如何なる

ポリペプチドまたはタンパク生成物でも高収量での工業的生産に *A. oryzae* の使用可能性を提供する。かかる生成物の例はキモシンまたはアロキモシンおよび他のレンネット、プロテアーゼ、アミロゲルコシダーゼ、*Aspergillus* からの酸安定アミラーゼ、菌のリバーゼまたは原生生物のリバーゼおよび熱に安定な細菌または菌のアミラーゼである。

本発明をアロキモシン、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、TAKA-アミラーゼおよび*Rhizomucor miehei* からのリバーゼの生産によって説明する。これらの酵素の遺伝子は、下記に更に詳細に説明するように、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーから得た。

〔実施例〕

以下の実施例において出発物質として使用したアラスミドは次の通りである。

p285 (ATCC No. 20681)

PCAHC91 Boelら、EMBO Journal、第3巻、(1984年)、1581~1585頁。

pIC19R Marshら、Gene、第32巻、(1984年)、481~485頁。

pSal43 Berseら、Gene、第25巻、(1983年)、109~117頁、John & Peberdy、Enzyme Microb. Technol. J.M. KellyおよびH.J. Hynes、EMBO Journal、第4巻(1985年)、475~479頁。

pBR322 Bolivar、F.ら、Gene、第2巻(1977年)、95~113頁。

pBR327 Covarrubias、L.ら、Gene、第13巻、(1981年)、25~35頁。

pUC9、pUC13

およびpUC19 Vieiraら、Gene、第19巻、(1982年)、259~268頁、およびMessing、Meth. in Enzymology、第101巻、(1983年)、20~27頁。

使用した菌株は次の通りである。

A. niger ATCC 1015、ATCC 10582

A. oryzae ATCC 20423、IFO 4177、ATCC 1011、

ATCC 9578、ATCC 14488~11491、
ATCC 11601およびATCC 12892、
E. coli MC1000 (Casabedian, M.J.およびCohen, S.N.、J. Mol. Biol.、第138巻、179~207頁)(NCIB 11956)。

Rhizomucor
miehei CBS 370.65

実施例1

アロキモシン遺伝子を含むアラスミドp285'proCの調製

プレアロキモシン遺伝子を仔牛の胃のcDNAライブラリーから単離し、G-CテイリングによってpBR322のPstI部位に挿入して(Chirgwinら、Biochemistry、第18巻、(1979年)、5294頁およびTruelsenら、Nucleic Acids Res.、第6巻、(1979年)、3081頁)、pR26を得た。pUC9をSalIで切断し、切断をクレノーポリメラーゼで満たし、T4リガーゼで連結した。生成するアラスミドをBamHI-EcoRIで切断して、2.7kbの大きなフラグメントをアロキモシン遺伝子のN末端を含む

pR26からの0.47kb BamHI-EcoRI フラグメントと連結し、pUC9'を作った。pUC9'は、アロキモシン遺伝子のN末端にBamHI部位を含む。pUC13をBamHI-NarIで切断して、NarI-XbaIと大きなそれぞれの小型フラグメントをアロキモシン遺伝子のC末端を含むpR26の0.64kb XbaI-BamHI フラグメントと連結して、アラスミドpUC13'を得た。pUC13'は、アロキモシン遺伝子のC末端にXbaI部位を含む。pUC13'の0.65kb XbaI-XbaI フラグメントを、pUC9'の0.48kb HindIII-XbaIおよびp285の1.1kb XbaI-HindIII フラグメントと連結して、第3図に示されるようにアロキモシン遺伝子を含むアラスミドp285'proCを生成させた。

実施例2

A. oryzae TAKA-アミラーゼA遺伝子のクローニング

じゃがいも澱粉上で成長させた*A. oryzae* Iw325から、Kaplanらの方法(Biochem. J.、第183巻、(1979年)、181~184頁)によって、mRNA

を調製した。TAKA-アミラーゼ遺伝子の1050bpを含む部分cDNAクローンを、mRNAをTAKA-アミラーゼにおけるアミノ酸295~299についての暗号化配列に相補的な4-マー・オリゴヌクレオチド混合物

A A A A
5' CG TT TC TG TT 3' (NOR-168)
G G G G

で特異的に感作することによって得た(Todaら、Proc. Japan Acad.、第58巻、シリーズB、(1982年)、208~212頁)。クローニング法は、Gubler & Hoffmann、Gene、第25巻、(1983年)、263~269頁記載の方法に準じた。cDNAクローンの両端および中央手での配列は、TAKA-アミラーゼのアミノ酸配列に対応する配列が存在することを示した。

ゲノムクローンの単離

A. oryzae Iw 325からの菌糸を収穫して、Boelらの上記文献に記載の*A. niger*について用いた方法に従ってDNAを調製するために加工した。Sau3Aで部分消化することによって生成した3~

10kbの制限フラグメントを、BamHIで消化して、脱リン酸化したpBR322と連結した(New England Biolabs)。50,000個の組換え体をオリゴヌクレオチドプローブNOR-168(上記)でスクリーニングして、7個がTAKA-アミラーゼを暗号化するDNAを含むことを見出した。一つのクローンをmRNA開始2.1kb上流を有するプロモーター領域を更に使用するのに選択した。プラスミドpTAKA 17についての制限マップを第2図に示す。*E. coli*株に移したpTAKA 17を1987年2月23日にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen(DSM)、Griesbachstrasse 8, D-3400, Goettingenに寄託され、受託番号DSM 4012を与えられた。DSMは1977年のブダペスト条約で認定された国際寄託当局であり、上記の条約のそれぞれ第9規則および第11規則に従って、公衆による寄託および入手の永続性を付与している。以下示す

実施例3

Rhizomucor miehei cDNAライブラリーの構成

真菌類*Rhizomucor miehei*(この菌種の形態学的および系統学的説明については、Skipper, M.A. A., On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*, Studies in mycology, Institute of the Royal Netherlands Academy of Science and Letters, 第17号(1978年)、53~71頁を参照されたい)はチーズ製造におけるミルクの凝固に広く用いられている酸プロテイナーゼ(*Rhizomucor miehei*プロテイナーゼ、以下RMPと省略する)を分泌する。*E. coli*においてこのタンパクのcDNA組換えクローンを得るために、全RNAをBoelら(EMBO J.、第3巻、1097~1102頁、1984年)およびChirgwinら(Biochemistry(Mash.)、第18巻、5294~5299、1979年)の方法によってホモゲナイズした*R. miehei* myceliumから抽出した。ポリ(A)含有RNAを、AvivとLeder(PNAS, USA、第69巻、1408~1412頁、1972年)によって報告さ

れたオリゴ(dT)-セルロース上で親和クロマトグラフィーを2サイクル行うことによって得た。オリゴ(dT)で感作した相補性DNAを合成して、GublerとHoffman(Gene、第25巻、263~269頁、1983年)が報告した方法に従って二重鎖とした。二重鎖を、Roychoudhuryら(Nucleic Acids Res.、第3巻、101~106頁、1978年)によって報告された方法によって、dCTPおよび末端デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼと連結した。プラスミドpBR327をPstIで線形化して、dGTPと連結した。オリゴ(dC)を連結したdsDNAを、Peacockらが記載した方法(Biochim. Biophys. Acta、第655巻、243~250頁、1981年)によってこのオリゴ(dG)を連結したベクターにアニーリングして、*E. coli* MC1000のhsdR⁺,M⁺誘導体(CasadabanとCohen, J. Mol. Biol.、第138巻、179~207頁、1980年)を形質転換して組換えクローンを生成させるのに用いた。

RMP特異的なcDNA組換え体の同定

16個のヘプタデカマー・オリゴデオキシリボ

ヌクレオチド

A A A A
 d(GC TCCC AA TA TA)
 G G G

の混合物であって、その一つが *Tyr-Tyr-Phe-Trp-Hsp-Mla* を暗号化する領域において RMP mRNA A に相補的であるもの (Bech と Foltmann, *Netb-Milk Dairy J.* , 第 35 卷, 275~280 頁, 1981 年) を Applied Biosystems, Inc. 製 DNA 合成装置上で合成し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。 *Rhizomucor miehei* cDNA ライブライマーからの約 10,000 個の *E. coli* 粗膜体を Whatman 540 沖紙に移した。コロニーを、Gergen らが記載した方法によってリーシスして、固定した (Nucleic Acids Res. , 第 7 卷, 2115~2135 頁, 1979 年)。フィルターを、Boel ら (EMBO J. , 第 3 卷, 1097~1102 頁, 1984 年) によって記載された方法によって 32 P-標識した RMP 特異的ヘプタデカマー混合物と交雑した。フィルターの交雑と洗浄は 40°C で行い、次いでインテンシファイラー・スクリーンを用いて 24 時間オートラジオグラ

ラフィーを行った。ミニプレプ (Miniprep) プラスミド DNA は、標準的な方法 (Birnboim と Doly, *Nucleic Acids Res.* , 第 7 卷, 1513~1523 頁, 1979 年) によって交雑するコロニーから単離し、cDNA インサートの DNA 配列を Maxam と Gilbert の方法 (Methods Enzymol. , 第 65 卷, 499~560 頁, 1980 年) によって確立した。

pRMP1016 は、mRNA の 5' 未翻訳末端の部分を含み、次いで 69 個の酸の長いアレプロ領域と 300 個のアミノ酸を PMP タンパクの成熟部分に暗号化する領域中に伸びていることを示した。 pRMP1016 は RMP mRNA の完全な 3' 末端に対応するインサートを含まなかつたので、cDNA ライブライマーをクローン pRMP1016 からの 3' P ニックが翻訳された 3' 特異的制限フラグメントで再度スクリーニングすることによって、クローン pRMP2931 を単離した。このクローンは 3' 未翻訳領域の部分と RMP タンパクのカルボキシ末端部分を暗号化する 270 個のトリプレットを有する開放読み込み枠を含む。それ故、pRMP1016 および

pRMP2931 は著しくオーバーラップしており、2 個のクローンの結合した配列は、*R. miehei* プレアプロ RMP cDNA の配列を与える。1416 個のヌクレオチドの数では、cDNA クローニング法から生成する G : C テイルの間に配列した。確立した DNA 配列を第 4 a および b 図に、RMP への前駆体の推定アミノ酸配列と共に示す。第 4 a および b 図では、水平線は cDNA ライブライマーのスクリーニングに用いた合成オリゴ混合物の位置を示している。矢印は、元の RMP の成熟において加工が起こる位置を示している。ヌクレオチドは開始 Met コドンにおける第一の塩基から番号を付け、アミノ酸は成熟 RMP における第一の残基から番号を付けている。この cDNA 配列から、RMP は 69 個のアミノ酸のアロペプチドで 430 個のアミノ酸の長い前駆体として合成されると結論することができる。この前駆体における推定上のシグナルペプチダーゼ加工部位 (von Heijne, *Eur. J. Biochem.* , 第 133 卷, 17~21 頁, 1983 年) は、Mla(-48) および Arg(-47) の間にあると考えら

れ、成熟 RMP は Glu-1 および Mla(+1) の間での自動タンパク分解性開裂によって生成する。RMP の cDNA で推定したアミノ酸配列は、以前報告された部分的アミノ酸配列 (Bech と Foltmann, *Netb-Milk Dairy J.* , 第 35 卷, 275~280 頁, 1981 年) と良好に一致している。

RMP cDNA を用いて更に構成作業を促進するため、次のようにしてクローン pRMP2931 において同定された TAA 停止コドンに対して 3' の *Bam* I 部位に *BindIII* リンカーを挿入した。すなわち、25 μ g pRMP2931 を *Pst* I で消化して RMP cDNA を得た。このインサートを 1% アガロースゲル電気泳動法で精製し、ゲルから電気溶出し、フェノールおよびクロロホルム抽出によって精製し、NaCl およびエタノールで沈澱させた。RMP の 3' 半分を暗号化するこのフラグメントを *Bam* I で消化し、*Bam* I 付着制限部位末端を 4 個の dNTP と *E. coli* DNA ポリメラーゼの Klenow フラグメントとの混合物で満たした。これらの満たした末端に T4-DNA リガーゼ反応において

HindIII リンカーを加えた。連結反応混合物をフェノールとクロロホルムで抽出して、DNAを4 M 酢酸アンモニウム/エタノールで沈澱させた。精製したDNAを過剰量のHindIII 酶で消化して、380bp フラグメントを6%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。RMP開放読取り棒の3'末端とTAA停止コドンを含むこのフラグメントを、HindIIIで消化してアルカリ性ホスファターゼで処理したpIC19Rに連結した。この連結混合物を用いて競合する *E. coli* 細胞を形質転換し、形質転換体をアンビシリン含有選択プレート上で選択した。プラスミドDNAを形質転換体から精製し、正確な粗換体を制限エンドヌクレアーゼ消化とアガロースゲル電気泳動法によって同定した。かかる正確な粗換体、pRMP3'から、210bp BglII/HindIII フラグメントを6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって単離した。このフラグメントはアミノ酸297~299で BglII部位からのRMP cDNAの3'末端を含み、TAA停止コドン中を通り、挿入されたHindIII リンカー

まで伸びている。

RMP cDNAの5'部分は、1%アガロースゲル電気泳動法によって 997bp HindIII/BglII としてpRMPから単離した。HindIII部位は、プロセグメントにおいて残基-38, -35に対応する位置においてRMP-DNA中に配置されている。997bp 5' フラグメントをHindIIIで消化してホスファターゼ処理したpIC19R中で 210bp 3' フラグメントに連結した。この連結混合物を用いて、粗換体を *E. coli* から得て、3'部分に結合したRMPの5'部分を有する正確なプラスミドpRMPは制限酵素分析によって同定した。pRMPの構成を第5図に示す。pRMPはRMPプレ領域およびプロセグメントの5'半分を暗号化しない。

実施例4

活性RMPを分泌するように設計したAspergillus発現ベクターの構成

この実施例では、プラスミドをグルコアミラーゼプロモーター、シグナルおよびターミネーター

配列の制御下にRMPを発現するように設計して構成した。グルコアミラーゼプロモーターおよびターミネーター配列をベクターpCAMG91でクローン化したグルコアミラーゼゲノム遺伝子から誘導した。pCAMG91の構成はBoelら (EMBO Journal, 第3巻、1984年、1581~1585頁) によって報告されており、プラスミドpCAMG91のエンドヌクレアーゼ制限マップは第6図に示す。

pCAMG91をSalIおよびPstI制限エンドヌクレアーゼで消化した。上記消化物から、アガロースゲル上で698bp フラグメントを単離した。このSalI-PstI フラグメントはグルコアミラーゼmRNAの140bp 3'未翻訳部分を暗号化する領域を含む。この3' フラグメントはT4-DNAポリメラーゼで処理して、XbaI リンカーの添加およびXbaI 制限酵素での消化の前に制限部位を「プラント・エンド」させた。このグルコアミラーゼ遺伝子の3'末端をXbaIで線形化したpUC13に連結してグルコアミラーゼ遺伝子ポリ(A)付加領域を含むプラスミドpAMG/Termを生成させた。

pAMG/Termの構成は、第7a図に示す。

*A. niger*グルコアミラーゼ遺伝子の3'末端は、pAMG/Termからの700bp XbaI フラグメントとして得た。このターミネーター フラグメントを、XbaIで消化してホスファターゼ処理したpIC19Rに連結した。この連結混合物を用いて、*E. coli* から粗換体が得られ、正確なプラスミドpICAMG/TermであってpIC19Rの多重クローニング部位のHindIII 部位に面するターミネーター フラグメントの5'末端を有するものは制限酵素分析によって同定した。pICAMG/Termの構成を、第7a図に示す。pICAMG/Termから、グルコアミラーゼターミネーター(AMGターミネーター)領域を1%アガロースゲル電気泳動法によって 750bp HindIII/ClaI 制限 フラグメントとして単離した。

pCAMG91から、グルコアミラーゼプロモーター(AMGプロモーター)を、グルコアミラーゼシグナルペアチドを暗号化する領域、ヘキサペプチド-プロセグメントおよび3.5kb ClaI/BssHII フラグメントとしてのpBR322アンビシリン耐性遺伝

子(Amp)と共に、1%アガロースゲル電気泳動法によって単離した。合成BamHII/HindIII リンカーは、Applied Biosystems Inc. 製DNA合成装置上で合成した2種類の合成31マー・オリゴヌクレオチドから調製した。合成リンカーは下記の構造を有する。

R V S K Q S E S K D
 CGCGCTAAGTAAGCAGACCCAGCCAAGCATA
 ATTCAATTCTCGCTCTCGTTCTATTCGA

このリンカーを、3.5 kbグルコアミラーゼプロモーターを含むフラグメントおよび750 bpグルコアミラーゼターミネーターを含むフラグメントとの連結反応に用いた。連結混合物を用いて *E. coli* を形質転換して、正確な組換体、p873は制限エンドヌクレアーゼ消化によって同定した。単離したp873はHindIII クローニングベクターであり、この中に適当なHindIII cDNAフラグメントをグルコアミラーゼヘキサペプチドプロセグメントおよびグルコアミラーゼ転写ターミネーター領域の間に挿入することができる。挿入したcDNAは

グルコアミラーゼプロモーターによって転写制御され、翻訳された融合生成物の分泌はグルコアミラーゼシグナルペプチドとグルコアミラーゼヘキサペプチドプロセグメントとによって指示される。p873をHindIIIで消化して、アルカリ性ホスファターゼで処理して、RMPの消化物から精製した1.2 kbHindIIIと連結した。

連結混合物を用いて *E. coli* を形質転換し、RMPを発現させるために正確な位置に挿入されたRMP cDNAを有する組換体p886は制限エンドヌクレアーゼ消化によって単離されて特徴化された。p886は以下の構造：グルコアミラーゼシグナルペプチド、グルコアミラーゼヘキサペプチド、RMPからのプロペプチドのアミノ酸ー45からー1、成熟RMPの361個のアミノ酸を有するRMP前駆体を暗号化する。p886の構成を、第7b図に示す。

実施例5

本発明の好ましい態様では、アレプロRMPの開放読み取り棒を、*A. niger*からのグルコアミラーゼ遺伝子または*A. oryzae*からのTAKA-アミラーゼ遺伝子からのプロモーターの制御下において発現アラスミドに挿入すべきである。これを行うために、BamH I 制限エンドヌクレアーゼ部位を、次の工程によってアレプロRMPのシグナルペプチドの開始メチオニンコドンの5'に挿入した。

pRMP1016を、cDNAにおいてアミノ酸残基Ser(-66)およびGln(-85)に対応する位置で切断するDde Iと、cDNAにおいてアミノ酸残基Lys(-38)およびLeu(-35)に対応する位置で切断するHindIIIで消化した。精製する89 bp Dde I/HindIII フラグメントを8%ポリアクリルアミドゲル上で精製し、フェノールおよびクロロホルム抽出の後電気溶出し、エタノール沈澱した。以下の配列を有する合成DNAフラグメントは、アプライドバイオシステム社製DNA合成装置上で2個のオリゴヌクレオチドとして合成した。

M L F S
 GATCCACCATGCTGTTCTC オリゴ697/698
 GTGGTACCGACAAGGAACT

このフラグメントは、開始Met-コドンに対してBamH I 付着末端5'および3'末端にDde I 付着末端を有する。これら2個のオリゴヌクレオチドは、ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼでキナーゼ化し、互いにアニーリングして、次いでBamH I/HindIIIで消化したpUC13ベクター上でpRMP1016から精製した89 bp Dde I/HindIII RMPフラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、正確な組換体をミニプレブ精製アラスミド上で制限酵素消化によって同定した。正確な組換えアラスミドを配列して、使用したオリゴヌクレオチドの配列を証明した。かかる正確なアラスミドpRMP5'をBamH IおよびHindIIIで消化して、開始Metコドン、RMPシグナルペプチドおよびRMPプロセグメントの部分を有する110 bp BamH I/HindIII フラグメント10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルム抽出し、エタノールで沈澱した。RMP開放読み込み棒の残

りおよびAMGターミネーター配列をEcoRIで消化し、HindIIIで部分消化した後プラスミドp688から得た。これによって、1.9 kbフラグメントを放出し、このフラグメントをアガロースゲル電気泳動法、電気溶出フェノールおよびクロロホルム抽出の後、エタノールで沈澱させた。この1.9 kbフラグメントを、BamHIおよびEcoRIで消化したpUC13ベクター中でpRM5'からの[10bp BamHI/HindIII]に連結した。

この連結混合物を用いて、*E. coli*細胞を形質転換し、正確な組換体をミニプレア精製プラスミド上で制限酵素消化によって同定した。かかる正確な組換体は、pRNPAMGTermであった。

pRNPAMGTermの構成を第8図に示す。

実験例6

*Aspergillus niger*グルコアミラーゼプロモーターによって*A. oryzae*中で活性RMPを分泌するように設計された*Aspergillus*発現ベクターの構成

グルコアミラーゼプロモーターを以下のように

上でDNAフラグメントを分離した後、175bp BglIIIフラグメントを電気溶出によって単離することができた。このフラグメントは、開始メチオニンコドンに対して5'のSlaNI制限部位に対応する位置に挿入されたBglIIIリinkerを有する。このDNA切片をBglIIIで消化したアルカリホスファターゼ処理したpIC19Rベクターに連結して、この連結混合物を用いて*E. coli*細胞を形質転換した。生成する形質転換体の中で、正確なプラスミドをミニプレアプラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。かかる正確なプラスミドp8404.1をNsiIおよびBglIIIで消化して、グルコアミラーゼ遺伝子の5'未翻訳領域をプロモーター領域の3'部分の約100bpと共に含む0.16kbフラグメントを放出した。このフラグメントを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって精製した。このフラグメントをpCAMG91からのグルコアミラーゼプロモーター領域の残りの部分に結合させるため、以下の工程を

して単離した。25μgのpCAMG91をEcoRIおよびBssHII制限エンドヌクレアーゼで消化した。この二重消化の後、270bp DNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって単離することができた。このフラグメントは、プロモーター領域の一部分、5'未翻訳領域およびグルコアミラーゼ遺伝子(AMG遺伝子)のシグナルペアブチドをカバーする。アガロースゲルからDNAを電気溶出した後、フラグメントをフェノールおよびクロロホルム抽出し、次いでエタノール沈澱することによって精製した。次いで、270bpの長いフラグメントをSmaIで消化した。この酵素は、グルコアミラーゼ遺伝子の開始ATGメチオニンコドンに対して5'に開裂部位を有する。完全に消化した後、DNAをDNAポリメラーゼIの大きなフラグメント(Klenow)および4種のdNTP総てで処理して、DNA上にプラントエンドを生成させた。このDNAに、DNAリガーゼを有するBglIIリinkerを加えて、DNAをBglII制限酵素の過剰量で消化した。10%ポリアクリルアミドゲル

を行った。25μgのpCAMG91をBssHIIで消化した後、更にNdeIで部分的に消化した。フラグメント末端を4種総てのdNTPおよびDNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで溝とした後、1.4kbDNAフラグメントを1%アガロースゲル上で単離した。このフラグメントは、総てのプロモーター領域を5'未翻訳領域およびシグナルペアブチド暗号化領域と共に含んでいた。このフラグメントを電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって、DNAを濃縮した。NsiIで消化した後、DNAを1%アガロースゲル上で流して、1.2kb NdeI-NsiIフラグメントを電気溶出によって単離した。このDNAは上記反応でNdeI部位にプラントエンドを生じ、これをNsiI-BglIIで消化したpIC19Rベクター中のp8404.1からの0.16kb NsiI-BglIIフラグメントに連結させた。連結混合物を用いて、*E. coli*細胞を形質転換し、精製する形質転換体の中から、正確な組換体をミニプレアプラスミドの制限酵素消化によって同定した。上記の正確な組

換体、pB408.3をHindIII およびBglIIで消化して、グルコアミラーゼ(AMG)アロモーターを1%アガロースゲル上で1.4 kbフラグメントとして単離した。このフラグメントを電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱した。このグルコアミラーゼアロモーターフラグメントを次に、HindIII-EcoRIで消化したpUC19ベクター中のpRMPANGTermからの2.0 BamHI-EcoRIフラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli*細胞を形質転換し、精製する形質転換体の中から、正確な組換体をミニアレアプラスミドの制限酵素消化によって同定した。上記の正確な組換体の一つp778を大規模に成長させて、組換えプラスミドを単離して、プラスミド調製物をCaCl₂／氯化エチジウム遠心分離によって精製した。このプラスミドをグルコアミラーゼアロモーターおよびターミネーター配列の制御下においてRMPの合成を指示する。p408.3の構成を第9a図に示し、p778の構成を第9b図に示す。以下余白

実施例7

Aspergillus oryzae TAKA-アミラーゼアロモーターによる活性RMPを分泌させるように設計された*Aspergillus*発現ベクターの構成

Aspergillus oryzae TAKA-アミラーゼゲノム遺伝子を含むプラスミドpTAKA 17(実施例2を参照されたい)50μgをSalIで消化した。この酵素は、成熟TAKA-アミラーゼのアミノ酸残基26に対応する位置においてゲノムDNAでの制限部位を有する。もう一つのSalI制限部位はこの位置に対して約1300個のヌクレオチドだけ上流の、上流アロモーター領域の5'末端に配設される。SalI消化の後、この1300bpアロモーターを含むフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製し、DNAをフェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって精製した。次いで、DNAをエクソヌクレアーゼIII緩衝液中に溶解して、Henikoff,S.(Gene, 第28巻、351~359頁、1984年)の方法に従ってエクソヌクレアーゼIIIで消化した。反応を停止して、それ

ぞのDNA末端において約130bpの欠失を得た。この方法ではTAKA-アミラーゼ遺伝子の暗号領域のSalI部位からの約130bpの欠失は、開始メチオニンコドンの上流に多重クローニング部位リンクを導入する機会を生じる。エクソヌクレアーゼIIIで処理したDNAを、Henikoff,S.(Gene, 第28巻、351~359頁、1984年)の方法に従ってS1ヌクレアーゼIIIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出した後エタノールで沈澱した。S1ヌクレアーゼで処理したDNAを補修して連結可能なプラントエンドを得ることは、Henikoff,S.(Gene, 第28巻、351~359頁、1984年)の方法に従って、4個のdNTP総てとDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを用いて行った。DNAをEcoRIで消化して、1300bp SalIフラグメントで切断して、2群のフラグメントを生成した。一つの群は約380bpの長さであり、蒸溜領域を表わしたが、他の群は620bpの長さであり、アロモーター領域を含んでいた。EcoRI消化生成物のこれらの群をアガロースゲル

上で分離して、約620bpの長さのDNAフラグメントを電気溶出して、EcoRI/SmaIで消化したpUC19ベクターに連結した。連結混合物を用いて、競合する*E. coli*細胞を形質転換し、組換体から、ミニアレアプラスミドDNAを単離した。これらの欠失変異株を制限酵素消化によって特徴化して、開始メチオニンコドンに対して5'の欠失末端を有するプラスミドを同定した。所望な特徴を有する数個の候補を配列させ、ATG-メチオニンコドンにおけるAに対して9bpを欠失した5'を有する変異株(p9)を選択して、更に構成した。p9をEcoRIおよびHindIIIで消化して、フラグメントを含む845bp TAKA-アミラーゼアロモーターをアガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって単離した。pTAKA 17をSalIおよびEcoRIで消化して、TAKA-アミラーゼアロモーター上流領域を含む510bpフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって単離した。これ

らの2個のプロモーター領域を互いに連結させ、且つ *Sal* I および *Hind* III で消化した *pC19R* ベクターに連結させた。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、正確な組換体を、ミニアレブとして抽出されたプラスミドを制限酵素で消化することによって同定した。かかる組換体の一つ *p719* では、*Aspergillus oryzae* からの TAKA-アミラーゼプロモーター フラグメントは、多数の各種制限酵素消化液によって削除することができる 1.1 kb の移動可能なフラグメントとして見出されている。*p719* の構成を第10図に示す。

pRMPAMCTerm から、プレプロ RMP 開放読み取り枠およびグルコアミラーゼターミネーター領域 (AMCTerm) を、*Bam* H I および *Eco* R I で消化した後 2 kb フラグメントとして単離した。このフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、次いでフェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって精製した。*A. oryzae* からの TAKA-アミラーゼからのプロモーターを、*p719* を *Sal* I および *Bam* H I で消化した後に得られる 1.1

kb フラグメントとして単離した。このフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出、次いでエタノールでの沈澱によって精製した。1.1 kb プロモーター フラグメントを *Sal* I および *Eco* R I で消化した *pUC19* ベクターにおいて *pRMPAMCTerm* からの 2 kb *Bam* H I / *Eco* R I フラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、精製する組換体から、正確な組換体を、ミニアレブプラスミドを制限酵素で消化することによって同定した。かかる正確な組換体の一つ *p777* を大規模に成長させて、組換えプラスミドを単離し、プラスミド調製物を *CsCl* / 航化工チジウム遠心分離によって精製した。*p777* の構成を第11図に示す。

実施例8

Aspergillus oryzae TAKA-アミラーゼプロモーターの制御下による *Rhizomucor miehei* リバーゼを分泌させるように設計された *Aspergillus* 発現ベクターの構成 以下余白

E. coli におけるリバーゼ cDNA クローンの構成および同定

特異的オリゴヌクレオチドアローブを構成させることができると情報を得るために、精製した *Rhizomucor miehei* リバーゼ (Moskowitz, G. J. ら、 J. Agric. Food Chem., 第25巻、1977年、1148~1150頁) について部分配列を決定した。以下の説明では、RML という略号を *Rhizomucor miehei* リバーゼについて用いた。菌糸体および低分子量物質を除去した *Rhizomucor miehei* の培養液からの上澄液を、陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。カラムからの主要な脂肪分解性分画を、凍結乾燥する前に脱脂および限外済過した。次いで、凍結乾燥した粉末を、酸和性クロマトグラフィーに付した。カラムからの貯蔵したリバーゼ分画を脱脂して、限外済過によって濃縮した。次いで、この濃縮液を疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) に付して、HIC-精製からのリバーゼを用いてアミノ酸配列を決定した。配列の決定は、元の酵素 (N-末端配列) およびリバーゼを

Armillaria mellea プロテアーゼを用いてタンパク分解性消化を行った後に得られる選択されたフラグメントの両方について行った。配列の決定は、This, L. ら、(FEBS Lett. 1987年、印刷中) によって報告されたのと同じ方法で Gas Phase Sequencer (Applied Biosystems Model 470A) で行った。

RML を、酵素の基質に対する比率を 1:40 (モル:モル) としたことを除いて Moody ら (FEBS Lett., 第172巻、1984年、142~148頁) によって報告されたのと同じ *Armillaria mellea* プロテアーゼを用いて消化した。得られたフラグメントを HPLC によって分離して、UV 吸収を 280 nm および 214 nm で観察した。オリゴヌクレオチドアローブの構成のための好適なフラグメントを同定するには、これらのフラグメントは Try および / または Tyr を含むので、280 nm および 214 nm の間で高い比率を示したペプチドのみを配列した。

以下の N-末端配列が、元の RML を使用することによって見出された。

タンパク分解性消化液から単離されたフラグメントの一つは、配列 Arg-Thr-Val-Ile-Pro-Gly-Ala-Thr-Try-His-X-Ile-His を有し、このフラグメントを特異的オリゴヌクレオチドプローブの合成に用いた。

Rhizomucor miehei からのアスパラギン酸プロテイナーゼ (R M P) 組換え体を単離するために構成された実施例 3 からの上記生物の c DNA ライブライマーも用いてリバーゼに特異的な組換え体を同定した。オリゴヌクレオチドの混合物を、Applied Biosystems Inc. 製 DNA 合成装置で合成した。

5' ^ATCCCANGTNGCNCC 3' 430 / 431

を有する混合物は、アミノ酸Gly-Ala-Thr-Trp-

開始メチオニンコドンを有するシグナルペプチドの5'部分についての配列を含まないので、合成オリゴヌクレオチド(584)

5' CGAGAGGGGATGAGGGGTCC 3' . . . 584

を合成した。このオリゴヌクレオチド 584は、ボリペプチド領域で見られるアミノ酸配列

Pro-Pro-Leu-Ile-Pro-Ser-Arg

を略号化する領域における R M L m R N A に相補的である。オリゴ 584を T 4 ポリヌクレオチドキナーゼおよび 32 P-ア-ATP を用いて高い比活性にまでキナーゼ処理した後、記載された方法 (Boel, E. ら, PNAS, USA, 第 80 卷, 2866~2869 頁, 1983年) によって、Rhizomucor miehei m R N A での A M V リバース・トランスクリプターゼとのプライマー伸長反応に用いた。プライマー伸長反応生成物を 10% ポリアクリルアミド/尿素ゲル上で電気泳動して、2 個の c D N A 生成物を分割した。これらの 2 個の c D N A 、すなわち一つは 150 個のヌクレオチドの長さであり、もう一方は 180 個のヌクレオチド長さのものを、同

Aspを暗号化する領域において R M L mRNA に相補的であった。このペントペプチドは、精製した R M L タンパクのタンパク分解性フラグメントから得られるアミノ酸配列のセグメントとして同定された(上記参照)。

Rhizomucor siehei cDNAライブラリーを、RMP特異的混合物でスクリーニングするのに記載した方法と同様にして³²P-キナーゼしたリバーゼオリゴヌクレオチド混合物でスクリーニングした。交雑およびフィルターの最初の洗浄は、43°Cで行った。オートラジオグラフィーの後、フィルターを47°Cで洗浄した。強力な交雫を示したコロニーを単離して、対応するプラスミドにおいて挿入されたcDNAを配列してRML特異的組換体を同定した。かかる2個の組換体p353.7およびp353.16は、約1.2kbのインサートを有した。これらの2種類の組換体から得られるDNA配列は、シグナルペプチドの中央で開始し、ポリアテイヌにまで伸びている。この領域では、長い開放読取り枠を同定できた。2個の組換え体は

方とも電気溶出し、DNA配列のための化学的分解法によって配列した。両者のcDNAはプライマー領域から伸びており、開始メチオニンコドンに対して位置9のヌクレオチド5'までの読み取り可能な配列を生じた。この配列は、リバーゼ組換えcDNAプラスミドから得られた配列であることを示した。2個のプライマー伸長cDNA生成物の長さは、リバーゼmRNAの5'末端(CAP-部位)が第12図に示した第一のAヌクレオチドに対して約5または15ヌクレオチド5'に配列される。菌類からのmRNAの5'末端の位置におけるマイクロヘテロゲナイエティは、極めて一般的である。2個のクローニングしたp353.7およびp353.16から得られる配列をプライマー伸長分析からの配列と結合することにより、RML前駆体のアミノ酸配列を確立することができる。DNA配列およびRML前駆体の対応するアミノ酸配列を第12図に示す。第12図では、水平線はcDNA合成およびcDNAライブラリースクリーニングに用いられた合成オリゴの位置を示し

ている。矢印は、元のRMLの成熟において加工が起こる位置を示す。ヌクレオチドは、開始Metコドンでの最初の塩基から番号を付け、アミノ酸は成熟した元のRMLにおける最初の残基から番号を付ける。RMLを開始Metコドンから伸びている開放読み込み棒によって暗号化し、次いで停止コドンに達する前に363コドンを通過。この前駆体では、最初のアミノ酸残基は、典型的な疊水性シグナルペプチドから成る。von Heijne (Eur. J. Biochem., 第113巻、17~21頁、1983年) の生産則によれば、シグナルペプチドは、それぞれ、位置-71および-70でのAla-およびVal残基の間のシグナルペプチダーゼ開裂によって以下のプロペプチドから開裂する。

Rhinoscereus mieheiからの培養液の上澄みから得られる精製RMLのN末端アミノ酸配列分析は活性RML酵素のN末端としてSer-Ile-Hep-Gly-Gly-Ile-Araを同定したので、RML前駆体のプロペプチドは前駆体における次の70個のアミノ酸残基から成っていた。このN末端Ser残基から

始めて、成熟RMLは停止コドンに達するまでに289個の残基を通って伸びる。この成熟29500ダルトン酵素では、リバーゼ基質結合部位は、多数のリバーゼに保存されている残基Ser(144)の付近に配置される。RML mRNAの3'末端では、104個のヌクレオチドがTAA停止コドンとボリ(A)テイルとの間の未翻訳領域として配置された。このボリ(A)テイルに対して2ヨヌクレオチドでは、7AT塩基対から成る反復構造が見出されたが、典型的な真核生物のボリアデニル化シグナルは同定されなかった。

本発明の好ましい具体例では、RML cDNAについて多くの変更を行った。これらの変更は、開放読み込み棒に対して制限エンドヌクレアーゼ部位5'および3'をクローニングおよび付加の際に、cDNAに加えたG:Cテイルの除去を含む。多くの好都合な制限部位も、cDNAのシグナルペプチドおよびプロペプチド領域に導入された。

p353.18をFnuDIIで消化して、アガロースゲル

電気泳動によって880bp DNAフラグメント (RML cDNAの3'末端) を単離した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱した。

RML cDNAの3'末端を次いでSamIで消化し且つアルカリ性ホスファターゼで処理したpUC19ベクターに連結した。連結反応を用いて、競合するE. coli細胞を形質転換し、精製した形質転換体から正確な粗換体をミニプレアラスミドの制限酵素消化によって同定した。一つのかかる好適な粗換体p435.2をBamIIおよびHindIIIで消化し、0.69kbフラグメントをアガロースゲル電気泳動法で単離した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱した。RML cDNAのフラグメントは、3'未翻訳領域に結合したpUC19多重クローニング部位の主要部分を有していた。

RML cDNAの5'末端を、合成オリゴヌクレオチドを用いて再設計して、好都合な制限部位を導入した。合成フラグメント(RML 5')の

DNA配列を第14図に示す。導入した制限部位の位置および個々に合成したオリゴヌクレオチドの結合部位を水平線乃至垂直/水平線によって示す。精製するフラグメント(RML 5')を2%アガロースゲル上で150bpフラグメントとして精製し、電気溶出し、フェノールおよびCHCl₃で抽出し、更に連結反応を行う前にエタノールで沈澱した。

p353.7をBamIおよびBamIIで消化して、387bp RMLフラグメントを10%ボリアミリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出した後、エタノール沈澱をして、次いで合成RML 5'フラグメントおよびBamII/HindIIIで消化したpUC13ベクターにおいてp435.2からの0.69kb BamII/HindIIIフラグメントに連結した。連結反応を用いて、競合するE. coliを形質転換して、精製する形質転換体から正確な粗換体をミニプレアラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。一つのかかる正確な粗

換体pB544では、合成部分を配列して予想した構造を確認した。pB544の構成を第13a図に示す。pB544からアレプロRML cDNAをアガロースゲル電気泳動法によって、1.2 kb BamHIフラグメントとして単離した。*Aspergillus oryzae* TAKA-アミラーゼ遺伝子からのプロモーターおよび*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ遺伝子からのターミネーターに基づく発現ベクターを、以下のようにして調製した。p719(実施例7参照)をSalIおよびBamHIで消化した。生成する1.1 kb TAKA-アミラーゼプロモーターフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製した。pICAMG/Tera(実施例4参照)は、BamHIおよびEcoRIで消化した。生成する0.75 kb TAKA-アミラーゼターミネーターフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製した。フェノールおよびクロロホルム抽出の後、これらの2種類のフラグメントをエタノールで沈澱し、SalI/EcoRIで消化したpUC19ベクターに連結した。連続反応を用いて、*E. coli*を形質転換して、精製

する形質転換体から正確な組換体をミニアレープラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。一つのかかる正確な組換体p775をBamHIで消化して、アルカリ性ホスファターゼで処理した。pB544からの1.2 kb BamHI RMLアレプロcDNAフラグメントをこのp775ベクターに連結して、*E. coli*中に形質転換した。プロモーターとターミネーターとの間で正確な位置に挿入されたRMLアレプロcDNAを有する組換体p787を、*E. coli*形質転換体から抽出したミニアレープラスミド上で制限酵素による消化によって同定した。p787プラスミドDNAを大規模に成長させて、プラスミド調製物をCaCl₂/臭化エチジウム遠心分離によって精製した。p787の構成を第13b図に示す。

実施例9

*Aspergillus oryzae*の形質転換(一般的処理法)
100mlのYPD(shermanら、Methods in Yeast Genetics、Cold Spring Harbor Laboratory、1981年)に*A. oryzae*、IFO 4177またはそのargB突

異株の胞子を接種して、振盪しながら37°Cで約2日間培養した。ミラクロスを通して沪過することによって菌糸を回収して、0.6 MのMgSO₄ 200mlで洗浄した。菌糸を1.5mlの1.2 MのMgSO₄、1.0 mMのNaH₂PO₄、pH=5.8に懸濁させた。懸濁液を氷で冷却し、Novozyme 234、バッチャ1687を120ml含む緩衝液1mlを加えた。5分後、1mlの1.2 mg/ml BSA(Sigma、H25型)を加えて、緩やかに攪拌しながら1.5~2.5時間37°Cでインキュベーションし、顕微鏡下で検討した試料中において多数の原形質体が観察されるようになるまで継続した。

懸濁液をミラクロスを通して沪過し、沪液を無菌チューブに移して、5mlの0.6 Mソルビトール、100mMトリス-HCl、pH=7.0を積層した。

1000gで15分間遠心分離を行い、原形質体をMgSO₄クッシュンの上部から収集した。2容量のSTC(1.2 Mのソルビトール、10mMのトリス-HCl、pH=7.5、10mMのCaCl₂)を原形質体懸濁液に加えて、混合物を1000gで5分間遠心

分離した。原形質体ペレットを3mlのSTCに再懸濁して、再度成型した。これを繰り返した。最後に、原形質体を0.2~1mlのSTCに再懸濁した。

100μlの原形質体分散液を5~25μgの適当なDNAを10μlのSTCに懸濁したものと混合した。*A. oryzae*株からの原形質体をpSal43 DNA(*A. nidulans* argB遺伝子を担持するプラスミド)およびargB⁺株からの原形質体をp3SR2(*A. nidulans* argB遺伝子を担持するプラスミド)と混合した。混合物を室温で25分間放置した。0.2mlの60%PEG4000(BDH29578)、10mMのCaCl₂および1.0mMのトリス-HCl、pH=7.5を加えて、注意深く混合し(2回)。最後に0.85mlの上記溶液を加えて、注意深く混合した。混合物を室温で25分間放置し、2500gで15分間遠心分離し、ペレットを再度2mlの1.2 Mソルビトールに懸濁した。もう一回沈降させてから、原形質体を適当なアレートに塗布した。pSal43で形質転換したargB株からの原形質体を炭素および窒素源

として、それぞれグルコースおよび尿素を有し且つ浸透圧安定のために1.2Mソルビトールを含む最少限のプレート (Cove, Biochem. Biophys. Acta, 第113巻、1966年、51~56頁) に拡げた。p3SR2で形質転換したargB⁺株からの原形質体を、1.0Mスクロース、pH=7.0、窒素源として10 mMのアセタミド、およびバックグラウンド成長を抑制する20 mMのCsClを含む最少限のプレート (Cove, Biochem. Biophys. Acta, 第113巻、1966年、51~56頁) に塗布した。37°Cで4~7日間インキュベーションした後、胞子を回収して、滅菌水に懸濁し、塗布して單一コロニーとした。この処理法を繰り返して、2回の再分離の後、單一コロニーの胞子を定義した形質転換体として保存した。

実施例10

野生型 *A. oryzae*におけるTAKA-アミラーゼの発現

pTAKA 17を、実施例9に記載したように *A. nidulans* からのendS遺伝子を含むp3SR2で共形質

転換することによって、*A. oryzae* IFO 4177中に形質転換した。上記のように調製した原形質体を等量のpTAKA 17およびp3SR2であってそれぞれ約5 μgを用いた混合物とインキュベーションした。単一窒素源としてアセタミドを用いることができる9個の形質転換体を、2回再度単離した。YPD (Shermanら、1981年) 上で3日間成長させた後、培養液上澄みを SDS-PAGEによって分析した。ゲルを、コマージー・ブリリアント・ブルーRで染色した。最も良の形質転換体は、形質転換していないIFO 4177の10~20倍のアミラーゼを生成した。一つの形質転換体を更に研究するために選択して、2リットルKieler醸酵装置中で4%大豆ミール上で成長させ、成長中にグルコースを供給した。醸酵中に、培養液を激しく攪拌した。これらの条件下では、IFO 4177は約1g/lを生じ、形質転換体は酵素活性として測定したところ約1.2g/lのアミラーゼであった。酵素活性を澱粉を分解する能力として測定した (Cereal Chemistry, 第16巻、1939年、712~723頁)。使用した澱粉

はMerck Amylum solubile erg B.6であり、分析はpH4.7および37°Cで行った。外部からβ-アミラーゼを加えなかった。

実施例11

*A. oryzae*におけるRMPの発現

実施例7からのp777または実施例6からのp778を、実施例9に記載の処理法によってp3SR2と共に共形質転換することによってIFO-4177中へ形質転換した。形質転換体を選択して、実施例9に記載のように再度単離した。

形質転換体をYPD中で3日間成長させ、上澄みを SDS-PAGE の後にWestern blottingおよびELISAを行って分析した。p777およびp778からの形質転換体の上澄液は、RMP抗体と反応するタンパク50~150mg/lを含んでいた。プロテイナーゼは、*R. miehei* で生成したプロテイナーゼと比較して過剰にグリコシル化した。2つの形状のうち、一方はプロ型であり、他方は加工された成熟プロテイナーゼであると思われた。

p778の2種類の形質転換体およびp777の3種類の

形質転換体を、上記TAKA-アミラーゼ形質転換体と同様に醸酵装置中で成長させた。p778の2種類の形質転換体は、Kunitz法 (Kunitz, M., Jour. Gen. Physiol., 第18巻、1935年、453~468頁) によるミルク凝固活性として測定したところ、約0.2g/lおよび0.4g/lのRMPを生じ、p777の3種類の形質転換体は約0.5g/l、2.4g/lおよび3.3g/lのRMPを生じ、粗換えRMPの特異的活性は *Rhizomucor miehei* の活性と同じであると考えられた(これについては、後で確認した)。SDS-PAGEおよびSDA-PAGEの後にWestern-blottingおよびELISAを行ったところ、大規模で培養する場合には、1つの形状のRMPのみが存在することが判った。RMPはこれらの成長条件下でも、過剰にグリコシル化した。ゲル上にみられるタンパクの量は、酵素活性から予測された量とよく相関を有した。

RMPを親和性クロマトグラフィーおよび寸法排阻クロマトグラフィーによって培養液の上澄みから精製した。

精製した組換えRMPのN-末端配列を、Thimら(TEBS Lett.、1987年、印刷中)によって報告されたのと同様に気相配列装置を用いて、測定した。

組換えRMPの2つの形状はN-末端における加工が不均一であることを示した。一つの形状はAla-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Thr-Pro-Gly-Tyr-のN-末端配列を有し、もう一方はGly-Ser-Val-Asp-Thr-Pro-Gly-Tyr-Tyr-Asp-のN-末端配列を有した。N-末端でのかかる不均一加工も、Mucor miehieからの元のRMPについて記載されている(Paquet, D.ら、Neth. Milk Dairy J., 第35巻、1981年、358~360頁)。組換えRMPの不均一加工は元のRMPの不均一加工と良好な相関を有し、*A. oryzae*は本発明によれば正確な領域で組換えRMPを加工することができることが判った。

実施例12

*A. oryzae*におけるアロキモシンの産生に関する発現単位の構成

この構成は、*A. oryzae*アミラーゼプロモーターの制御下で*A. oryzae* TAKA-アミラーゼ遺伝子

遺伝子(ブレTAKA)からのシグナル配列に融合し且つ約500bp上流のTAKA-アミラーゼ配列が先行するアロキモシン遺伝子(アロキモシン')の5'部分を含むプラスミドpToC51を単離した。pToC51の構成を第15a図に示す。

pR26をHinf Iで切断して、DNAポリメラーゼIおよび4個のdNTPの大きなフラグメント(Klenow)で処理し、Xba Iで切断した。アロキモシン遺伝子の3'末端を含む750bpフラグメントを単離した。このフラグメントの3'末端でのHindIIIを挿入するために、pUC9をXba I/Hinf Iで切断して、大きなフラグメントをアロキモシン遺伝子の3'末端を含む750bpフラグメントに連結した。

pTAKA 17からの5.6kb EcoRI-Cla Iフラグメントを単離して、同じプラスミド貸せの2.6kb Cla I-HindIIIフラグメントおよび*A. niger*グルコアミラーゼ遺伝子ターミネーターおよびポリA部位を含むpICAMG/Term(実施例4参照)からの0.7kb EcoRI-HindIIIと連結した。生成するア-

からのシグナルペプチド配列がすぐ先行するアロキモシン遺伝子を含む。この構成は更に、*A. niger*グルコアミラーゼ遺伝子と*E. coli*複製体からのターミネーターを含む。

p285' proC(実施例1参照)からの約430 bp *Bam*H I/Xba I フラグメントおよび以下の配列

AATTCCAGCTGCCGGGGGGAGATCACCAAC
GGTCCACGGCCGGGGCTCTAGTGGTCTAG

を有する合成オリゴマーをEcoRI-Xba I切断pUC19プラスミド中に挿入して、プラスミドpToC50aを生成した。

pToC50aをEcoRI-SacIIで切断し、pUC19を含む大きなフラグメントとアロキモシン遺伝子(アロキモシン')の5'部分を単離した。このフラグメントをpTAKA17からの0.6kb EcoRI-Bam Iフラグメントおよび以下の合成オリゴマーと連結した。

GCACCTGGCTTTGGC
GACGAAAC (KFN 280/281)

形質転換の後、*A. oryzae* TAKA-アミラーゼ遺

ラスミド輪pToC52として第15b図に示す。

pToC52をHindIIIで切断し、EcoRIで部分的に切断し、6.4kbフラグメントを単離した。これをpToC51からの0.9kb EcoRI-Xba Iフラグメントおよびアロキモシン遺伝子(アロキモシン)の3'部分を含むpUC9'PCからの0.7kb Xba I-HindIIIフラグメントと連結した。生成するプラスミドはpToC58と呼ばれ、第15b図に示す。

実施例13

*A. oryzae*におけるアロキモシンの発現

p3SR2(msdS遺伝子)またはpSal43(argB遺伝子)と共に形質転換することによって、pToC56を*A. oryzae* IF0 4177またはargB変異株に形質転換した。選択的培地で成長する形質転換体を、実施例9と同様に2回再度単離した。

形質転換体をYPD中で3日間成長させ、上澄液のアロキモシン含量をSDS-PAGE後Westernプロット上でELISAによって分析した。形質転換体は、上澄液中に1~10ng/lのアロキモシンの寸法免疫反応性タンパクを産生した。他の

免疫反応性タンパクは上澄液中に検出されなかつた。

実施例14

A. oryzae におけるRMLの発現

実施例8からのp787を、実施例9に記載の方法によってp3SR2で共形質転換することによってIFO-4177中に形質転換した。形質転換体を実施例9と同様に選択して、再度単離した。

3日間成長させた形質転換体のYPD培養液からの上澄液を、SDS-PAGEの後にWesternプロットおよびELISAを行って分析した。最良の形質転換体は、タンパク1リットル当たり2mgの成熟RMLの寸法を產生した。上澄液におけるリバーゼ活性を、トリプチリンを調製する能力として計測した(НОВО法AF 95.1/3-CB)。

この測定によって上澄液に2mg/lの活性リバーゼが存在することが判った。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、TAKA-アミラーゼプロモーターおよび上流プロモーター領域のDNA配列を示し、

第2図は、プラスミドpTAKA 17のエンドヌクレアーゼ制限マップを示し、

第3図は、プラスミドp285'proCの構成を示し、

第4aおよびb図は、3文字省略によって与えられる推定アミノ酸配列を有するプレプロRhizomucor miehei アスパラギン酸プロテイナーゼのDNA配列を示し、

第5図は、プラスミドpRMPの構成を示す。

第6図は、プラスミドpCAMG91のエンドヌクレアーゼ制限マップを示し、

第7a図はプラスミドpICAMG/Termの構成を示し、

第7b図は、プラスミドpBBBの構成を示し、

第8図は、プラスミドpRMPAMGTermの構成を示し、

第9a図は、プラスミドpB408.3の構成を示し、

第9b図は、プラスミドpB778の構成を示し、

第10図は、プラスミドpB719の構成を示し、

第11図は、プラスミドp777の構成を示し、

第12図は、3文字省略によって与えられる推

定アミノ酸配列を有するプレプロRhizomucor mieheiリバーゼcDNAの配列を示し、

第13a図は、プラスミドpB544の構成を示し、

第13b図は、プラスミドp787の構成を示し、

第14図は、合成フラグメントRML5'リDNA配列を示し、

第15a図は、プラスミドpToC51の構成を示し、

第15b図は、プラスミドpToC58の構成を示す。

特許出願人

ノボ インダストリ
アクティーゼルスカブ

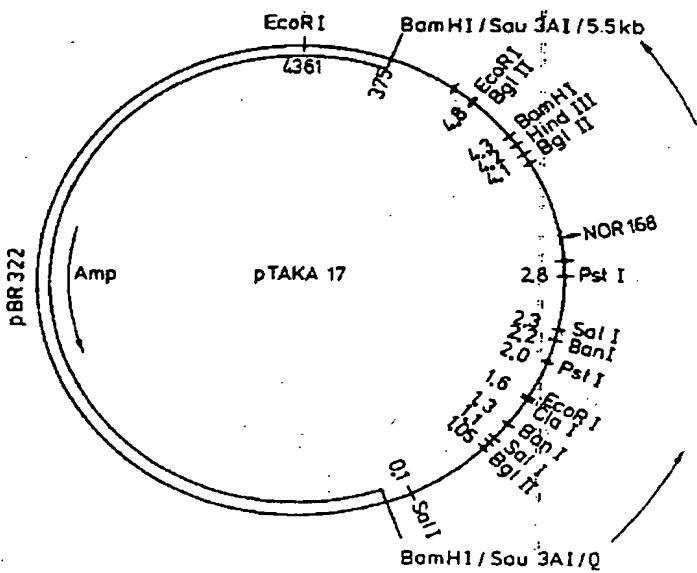
特許出願代理人

弁理士 青木 順
弁理士 西館 和之
弁理士 石田 敬
弁理士 山口 昭之
弁理士 西山 雄也

FIG. 1

-1176 AGATCTGCC TTATTAATCT OCTAGCTGA TCTCGACGTC ATTCCGATC
 -1177 -1157 -1147 -1137 -1127 -1117
 CGAGGCTGA TTATGATTA CATAACGCTC CGCGCTTAAC AGCTTAAAGAA
 -1126 CGAGCCAGT CAGCGCTTAAC AGCGCTTAAAT AGCTTAAAGAA AGCTTAAAGAA
 -1026 GTGAAATCT AGCCTTAAAC AGCTTAACTAA AATTCGATCT CGCAGTCGCG
 -976 ATTCGCTAT CAAACAGT TTATCAAC TGATTAAGG TGCGGAACGGA
 -926 GCTTAAATG ATATACAT ATTAAAGCAT TTATTAAGG AGCTTAAAGAA
 -876 CGGCGACGAA AGCGACATTA AAAAGGAAA GGGCTCTACTTAAACAGATTA
 -826 CTTTGAAA AGCGACATCA GTATTAAGG CGCGAATCTT TATTAAGGCG
 -776 CGATATCGG CAGTAAAGC CATAACGGCA GATAGACCTC TACCTATTA
 -726 ATCGCTCT AGCGCGCTC ATCGTAATG TTCTGGCTGT GGTTGACAGG
 -676 GCGATTAAT TACGCACTAC CGGATCTGAT AGAACTACTC ATTTTATAT
 -626 AGAGTCGA ATTCATAGTG TTTCATGAT TTAAATTT TATATGGGG
 EcorI
 -576 GCGTGGCA ACTCGCTGC GCGGCCAAT CGCTTACCA TTACCTAGG
 -526 GCTGTATTTT AGCTGAAAT CGTCAGGGAA TCGAAGACCA AACTGTTAAA
 -476 ACCCGGGAG TCACAGCAT CTAAGCCCAA GTCCTTCAGG GAGAAACCC
 -426 ACGTCCACA TCGAGGGCA AGGGCCACCT CTAGGGCAGCG GACCCACAT
 -376 CCNATTGAA GCACCAAAGC GAAACAGCC AGAAAAGG TGCGCCGTC
 -326 GGCCTTTCTT GCACGCTGA TCACTGGCAG CGATCCAAAC AACACCCCTC
 -276 AGAGTGACTA GGGCGGGAAA TTAAAGGGGA TTAAATTCGA CTCACACACA
 -226 AATCACGTC GCGCCGGTA TTGTCGTGA GAATGCAATT TAAACTCTTC
 -176 TGGGAAATGCC TGGATTCCTC CGCCCTCTAG CCTAGAGCTT AAGTATGTC
 -126 CCTTGCGATG GCGATGATAC AGCAACATA AATACAGCA AGGGATGCCA
 -76 TGCTGGGG AGGGCGGCG AGCAACATCAC ATCAAGCTC CCCPCTCTCTG
 -26 AACATTAAC CCCACAGAG GCATT

FIG. 2



3
FIG.

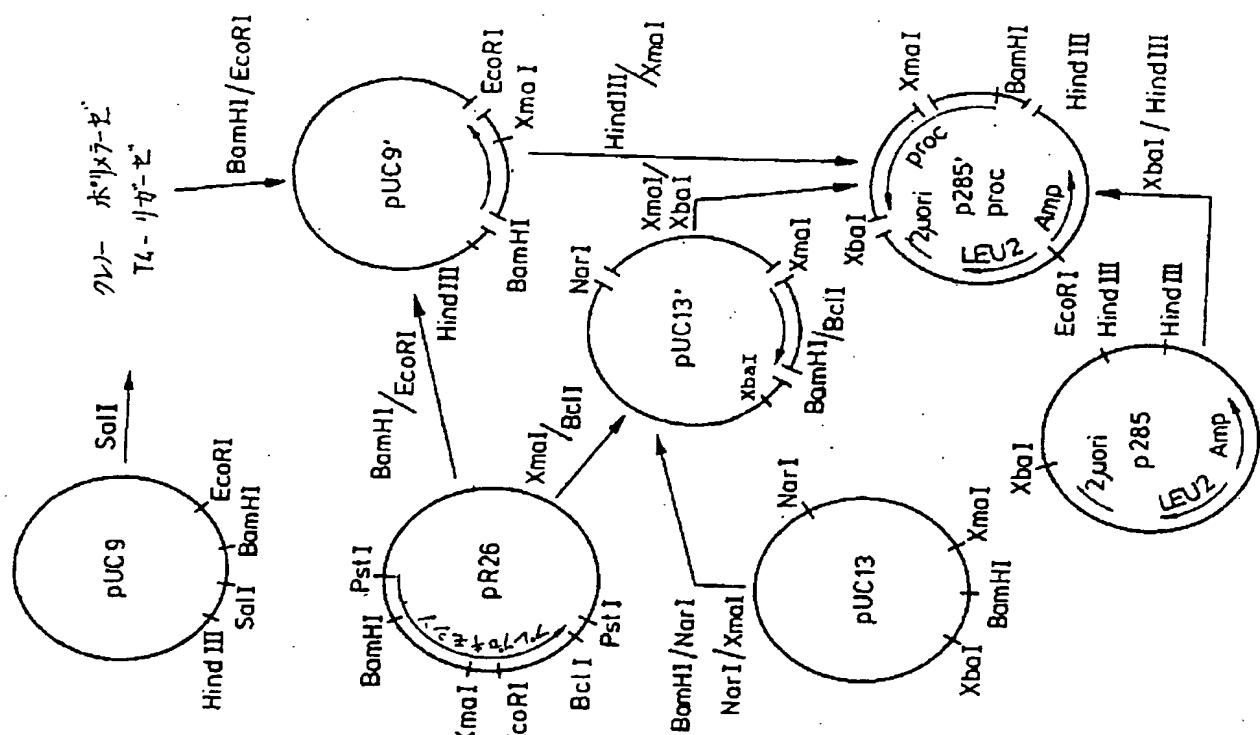


FIG. 49

ATCAGATTCCGACC	ATG CTC TTC TCT CAG ATT ACT TCT GCG ATC CTT TTA MET LEU PHE SER GLN ILE THR SER ALA ILE LEU LEU	36 -58
ACA GCG GCT TCT TTG TCG CTT ACC ACT GCT CGC CCG GTC TCC AAG CAA THR ALA ALA SER LEU SER LEU THR THR ALA ARG PRO VAL SER LYS GLN		84 -42
TCC GAG TCC AAG GAC AAG CTT CTG GCG CTT CCT CTC ACC TCG GTG TCC SER GLU SER LYS ASP LYS LEU LEU ALA LEU PRO LEU THR SER VAL SER		132 -26
CGC AAG TTC TCT CAA ACC AAG TTC GGT CAG CAA CAA CCT GCT GAG AAG ARG LYS PHE SER GLN THR LYS PHE GLY GLN GLN LEU ALA GLU LYS		180 -10
CTA GCA GGT CTC AAG CCC TTC TCT GAA GCT GCC GCA GAC GGC TCC GTC LEU ALA GLY LEU LYS PRO PHE SER GLU ALA ALA ALA ASP GLY SER VAL		228 7
GAT ACC CCC GGC TAT TAC GAC TTT GAT CTG GAG GAG TAT GCT ATT CCG ASP THR PRO GLY TYR TYR ASP PHE ASP LEU GLU GLU GLU TYR ALA ILE PRO		276 23
GTC TCC ATT GGT ACT CCT GGT CAA GAC TTT TTG CTC TTG TTC GAC ACT VAL SER ILE GLY THR PRO GLY GLN ASP PHE LEU LEU LEU PHE ASP THR		324 39
GGC AGC TCC GAT ACT TCG GTT CCA CAC AAG GGT TGC ACC AAG TCT GAA GLY SER SER ASP THR TRP VAL PRO HIS LYS GLY CYS THR LYS SER GLU		372 55
GGT TGT GTT GGC AGC CGA TTC TTT GAT CCA TCG GCT TCC TCC ACT TTT GLY CYS VAL GLY SER ARG PHE PHE ASP PRO SER ALA SER SER THR PHE		420 71
AAA GCA ACT AAC TAC AAC CTA AAC ATC ACC TAC GGT ACT GGC GGC GCA LYS ALA THR ASN TYR ASN LEU ASN ILE THR TYR GLY THR GLY GLY ALA		468 87
AAC GGT CTT TAC TTT GAA GAC GAC ATC GCT ATC GGC GAC ATC ACC GTG ASN GLY LEU TYR PHE GLU ASP SER ILE ALA ILE GLY ASP ILE THR VAL		516 103
ACC AAG CAA ATT CTG GCT TAC GTC GAT AAT GTT CGC GGC CCA ACT GCT THR LYS GLN ILE LEU ALA TYR VAL ASP ASN VAL ARG GLY PRO THR ALA		564 119
GAG CAG TCT CCT AAC GCT GAC ATT TTC CTT GAT GGT CTC CTC TTT GGT GCA GLU GLN SER PRO ASN ALA ASP ILE PHE LEU ASP GLY LEU PHE GLY ALA		612 135
GCC TAC CCA GAC AAC ACC GCC ATG GAA GCA GAG TAT GGA TCG ACT TAT ALA TYR PRO ASP ASN THR ALA MET GLU ALA GLY TYR GLY SER THR TYR		660 151

FIG. 4b

AAC ACT GTT CAC GTC AAC CTC TAC AAG CAA GGC TTG ATC TCT TCT CCT	708
ASN THR VAL HIS VAL ASN LEU TYR LYS GLN GLY LEU ILE SER SER PRO	167
CTT TTC TCG GTC TAC ATG AAC ACT AAC AGC GGC ACT GGA GAG GTC GTC	756
LEU PHE SER VAL TYR MET ASN THR ASN SER GLY GLY THR GLY GLU VAL VAL	183
TTT GGT GGA GTC AAC AAC AGC CTT CTC GGC GGC GAC ATT GCC TAC ACC	804
PHE GLY GLY VAL ASN ASN THR LEU LEU GLY GLY ASP ILE ALA TYR THR	199
GAC GTT ATG AGT CGT TAT GGT GGT TAT TAC TTC TGG GAC GCA CCC GTC	852
ASP VAL MET SER ARG TYR GLY GLY TYR TYR PHE TRP ASP ALA PRO VAL	215
ACA GGT ATC ACC GTC GAT GGA TCT CCT GCT GTC AGG TTC TCA AGA CCC	900
THR GLY ILE THR VAL ASP GLY SER ALA ALA VAL ARG PHE SER ARG PRO	231
CAA GCA TTC TTE ACC ATC GAT ACT GGC ACC AAC TTT TTC ATT ATG CCC TCA	948
GLN ALA PHE THR ILE SER GLY THR ASN PHE PHE ILE MET PRO SER	247
AGC GCC GCT TCT AAG ATT GTC AAA GCA CCT CTC CCT GAT GGC ACT GAA	996
SER ALA ALA SER LYS ILE VAL LYS ALA ALA LEU PRO ASP ALA THR GLU	263
ACC CAG CAG GGC TGG GTT CCT CTC TGC GCT AGC TAC CAG AAC TCC AAG	1044
THR GLN GLN GLY TRP VAL VAL PRO CYS ALA SER TYR GLN ASN SER LYS	279
TCG ACT ATC ACC ATC GTC ATG CAA AAG TCC GGC TCA AGC AGT GAC ACT	1092
SER THR ILE SER ILE VAL MET GLN LYS SER GLY SER SER SER ASP THR	295
ATT GAG ACT TCG GTT CCT GTC AGC AAA ATG CTT CTT CCA GTC GTC AAC	1140
ILE GLU ILE SER VAL PRO VAL SER LYS MET LEU ILE PRO VAL GLN AAC	311
TCG AAC GAG ACT TGC ATG TTT ATC ATT CTT CCT CCC GAC GGT GGT AAC CAG	1188
SER ASN GLU THR CYS MET PHE ILE ILE LEU PRO ASP GLY GLY ASN GLN	327
TAC ATT GTT GGC AAC TTG TTC CTC CCC TTC TTT GTC AAT GTT TAC GAC	1236
TYR ILE VAL GLY ASN LEU PHE LEU ARG PHE PHE PHE VAL ASN VAL TYR ASP	343
TTT GGC AAC AAC CGT ATC GGC TTT GCA CCT TTG GGC TCG GCT TAT GAA	1284
PHE GLY ASN ARG ILE GLY PHE ALA PRO LEU ALA SER ALA TYR GLU	359
AAC GAG TAA AGGGGCAACCAATTCTCTTAGCTGCTAGATAACCTTGAACTCTCTGAA	1343
ASN GLU TERM	
TATACATCTTATAACCTTTATTCACCTTTAACTGTATTCACATACCTTATTTCTCCT	1402

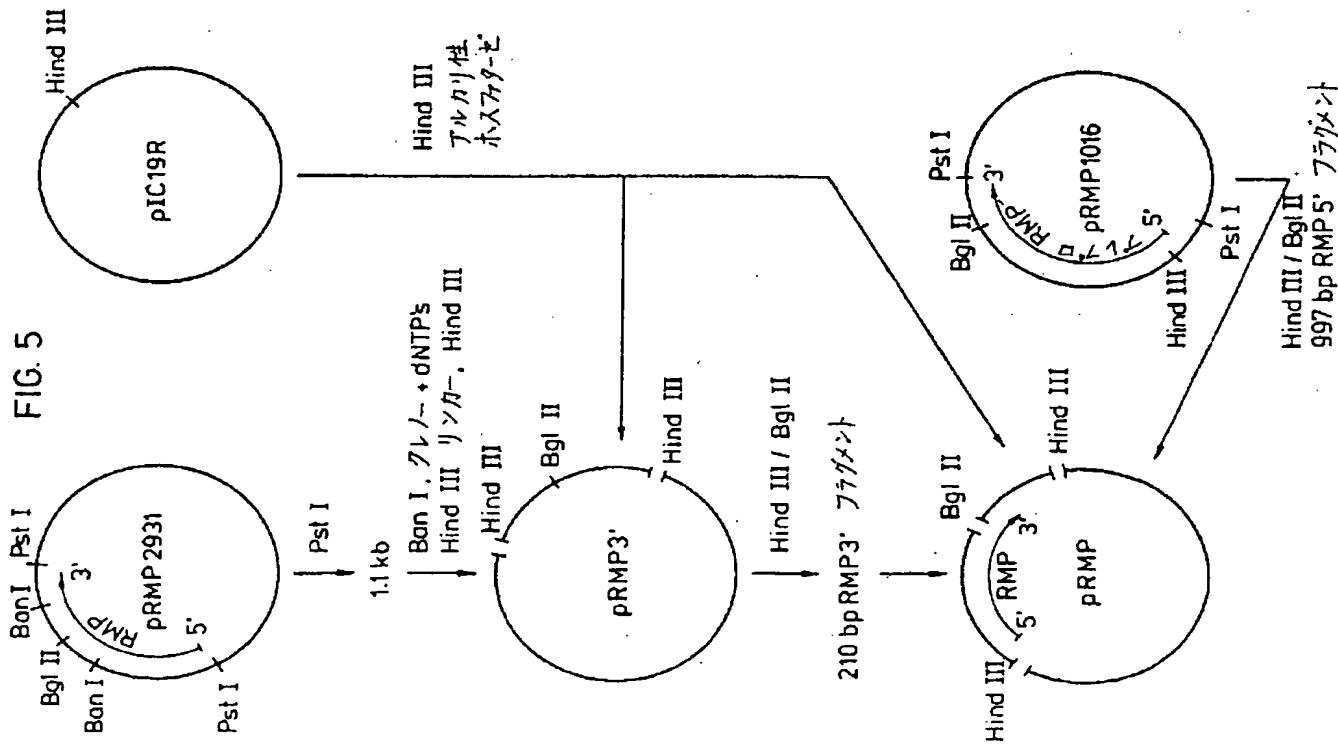


FIG. 6

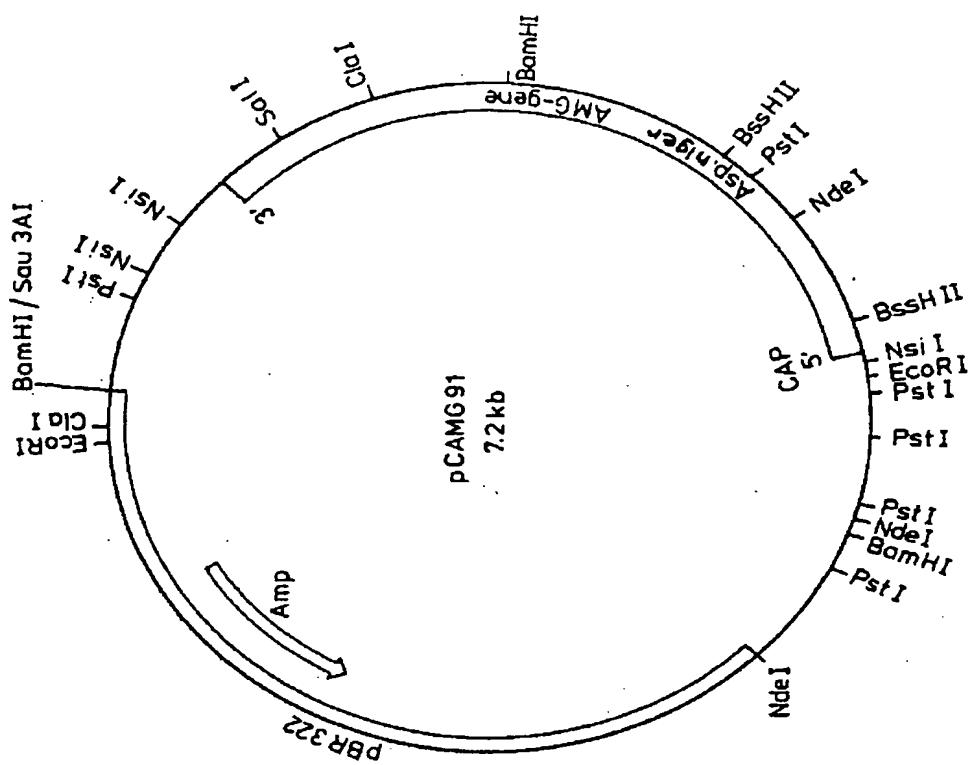


FIG. 7a

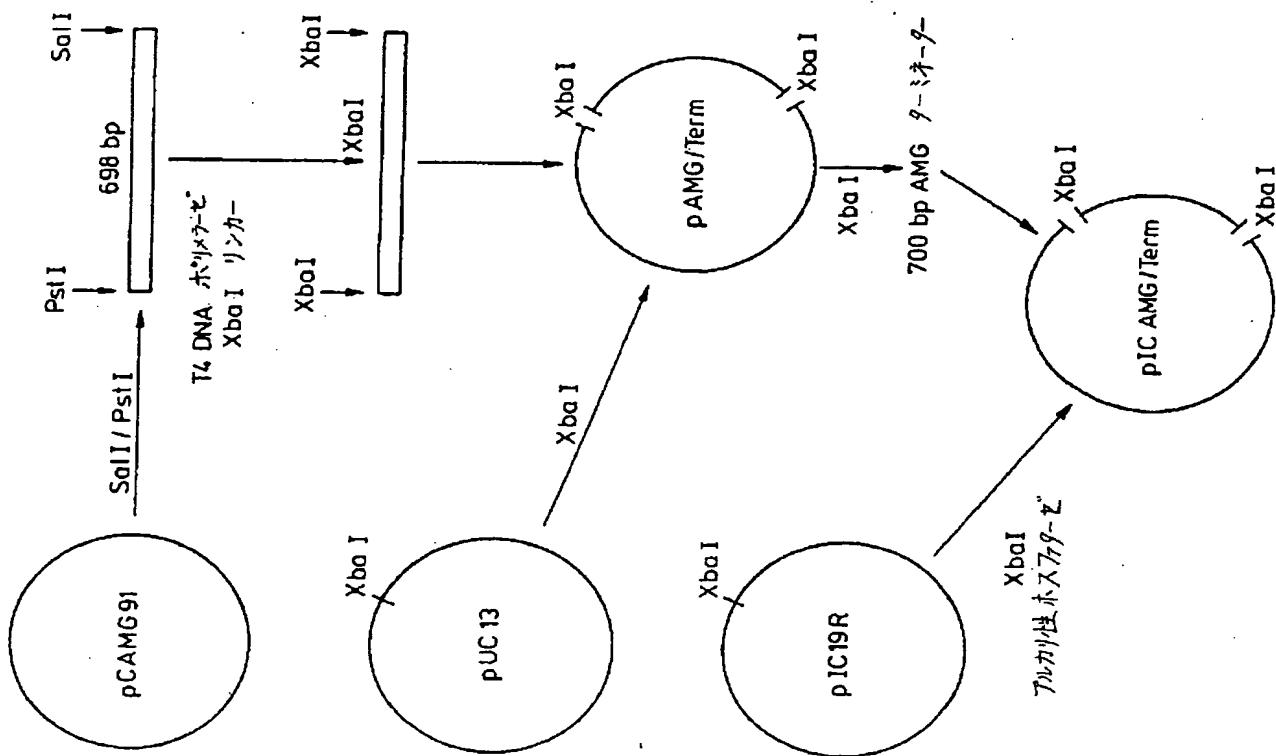


FIG. 7b

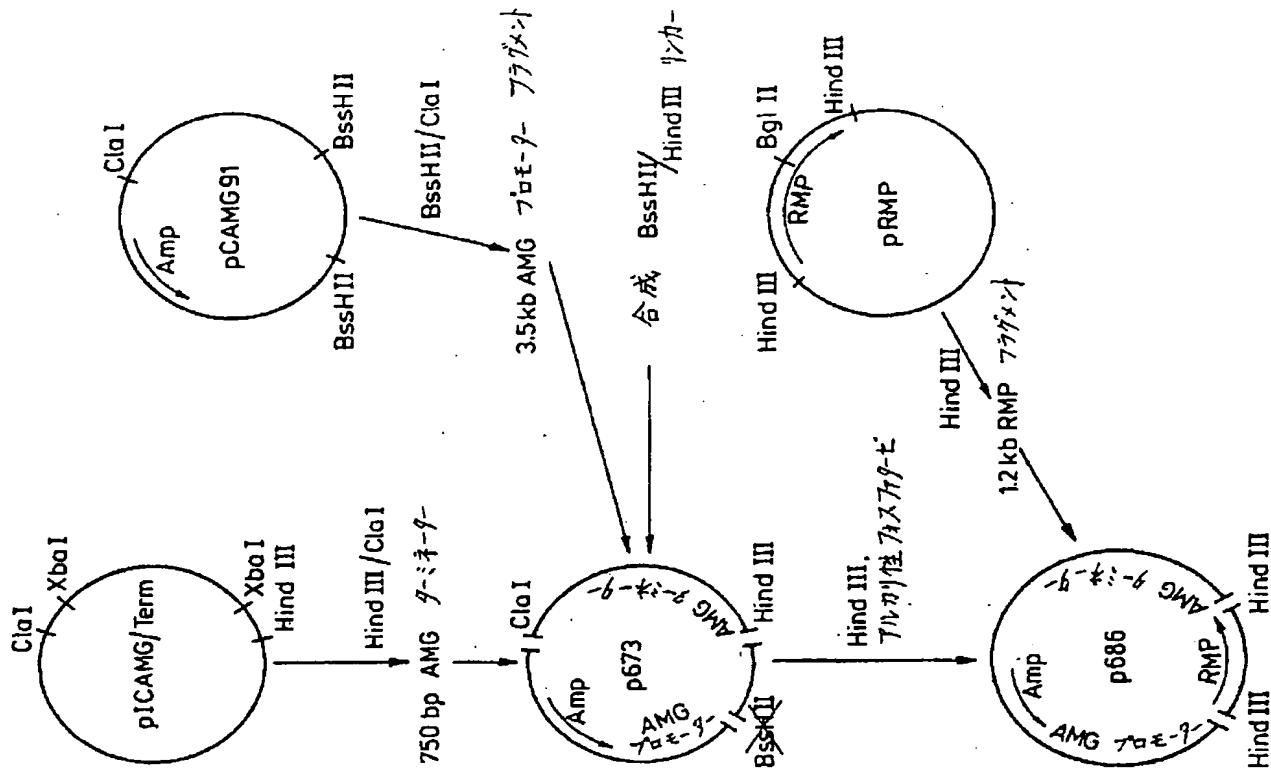


FIG. 8

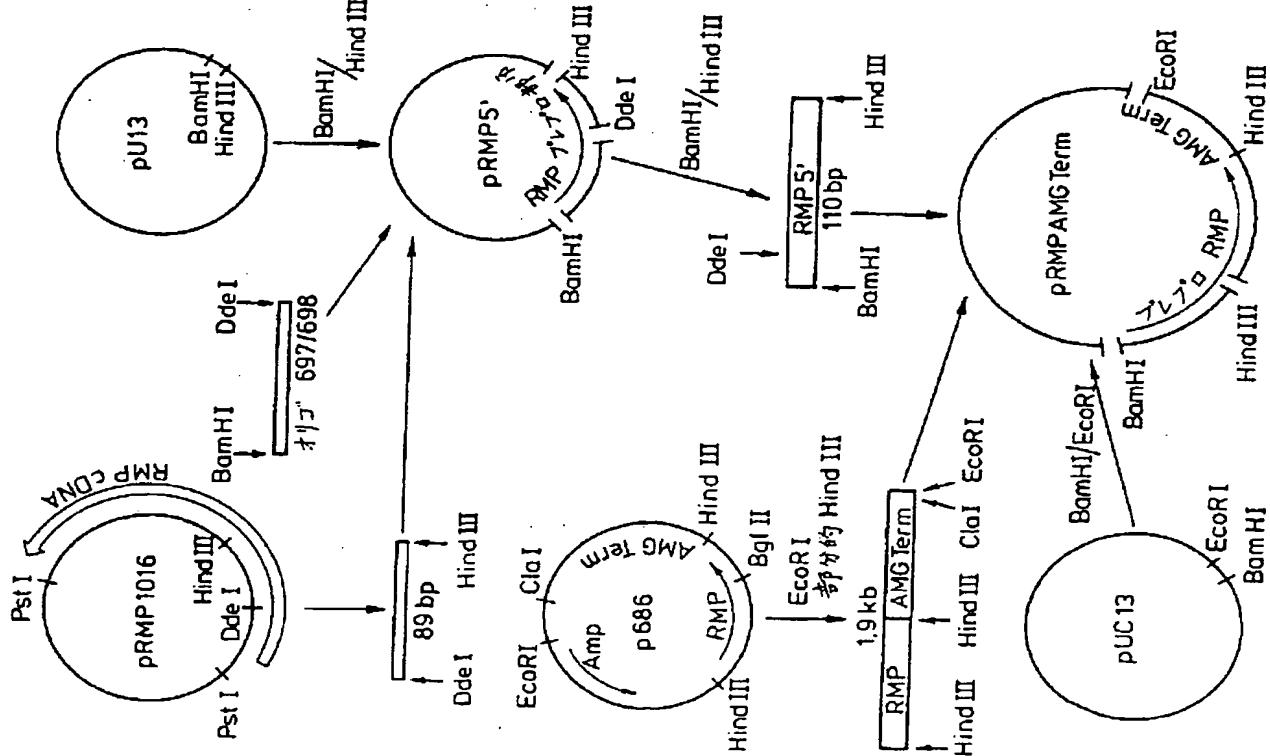


FIG. 9b

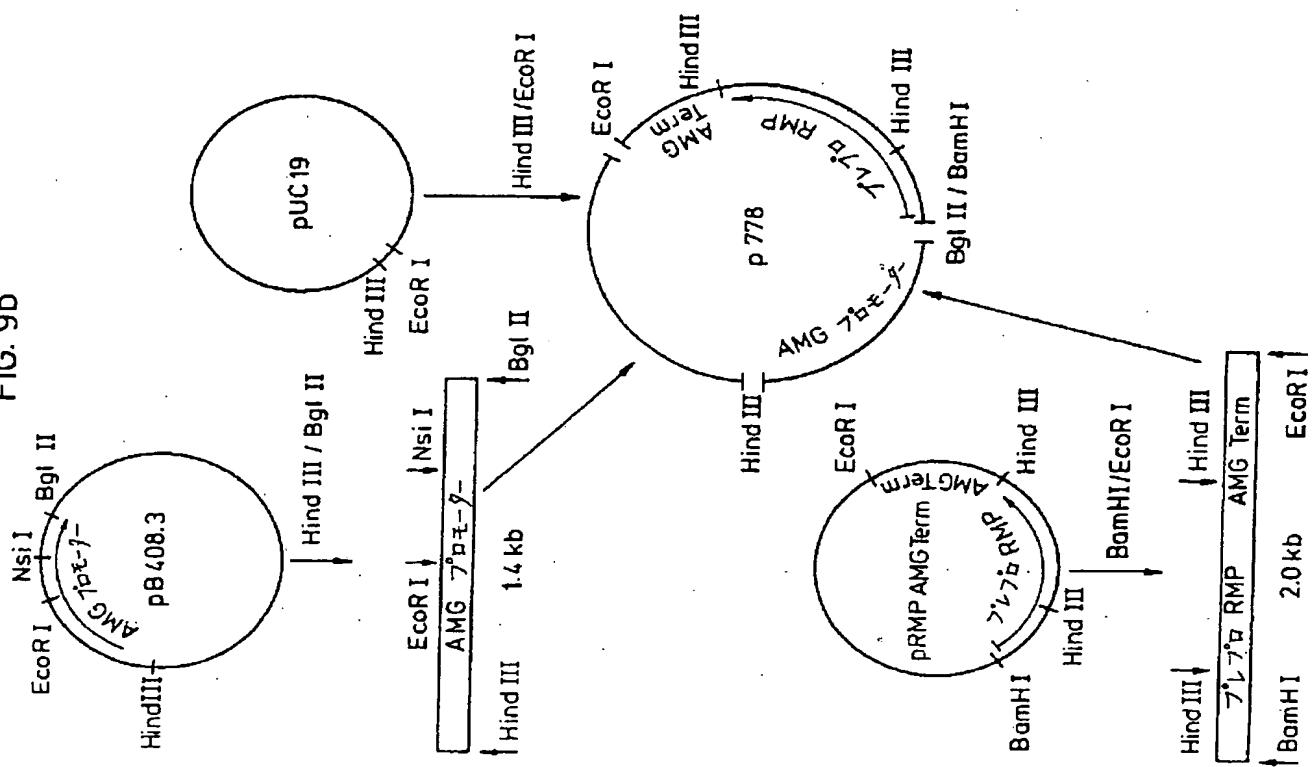


FIG. 9a

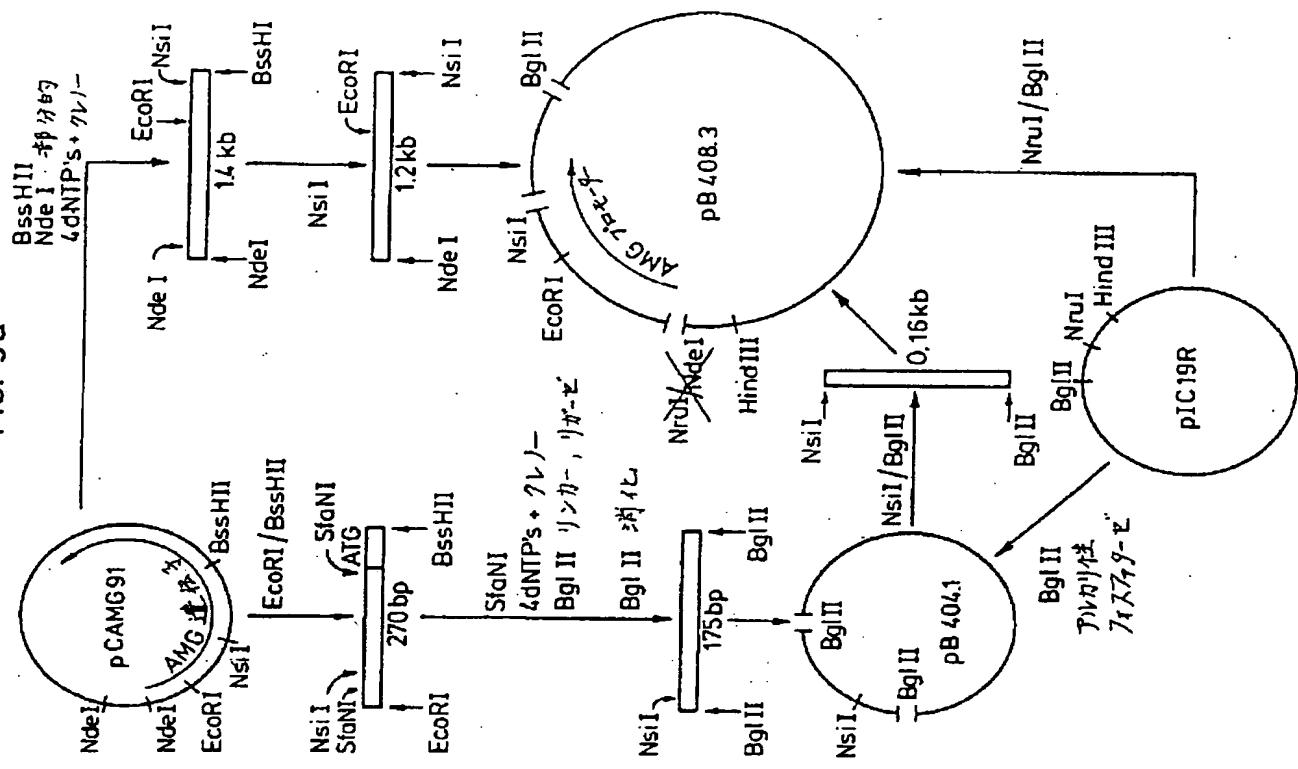


FIG. 10

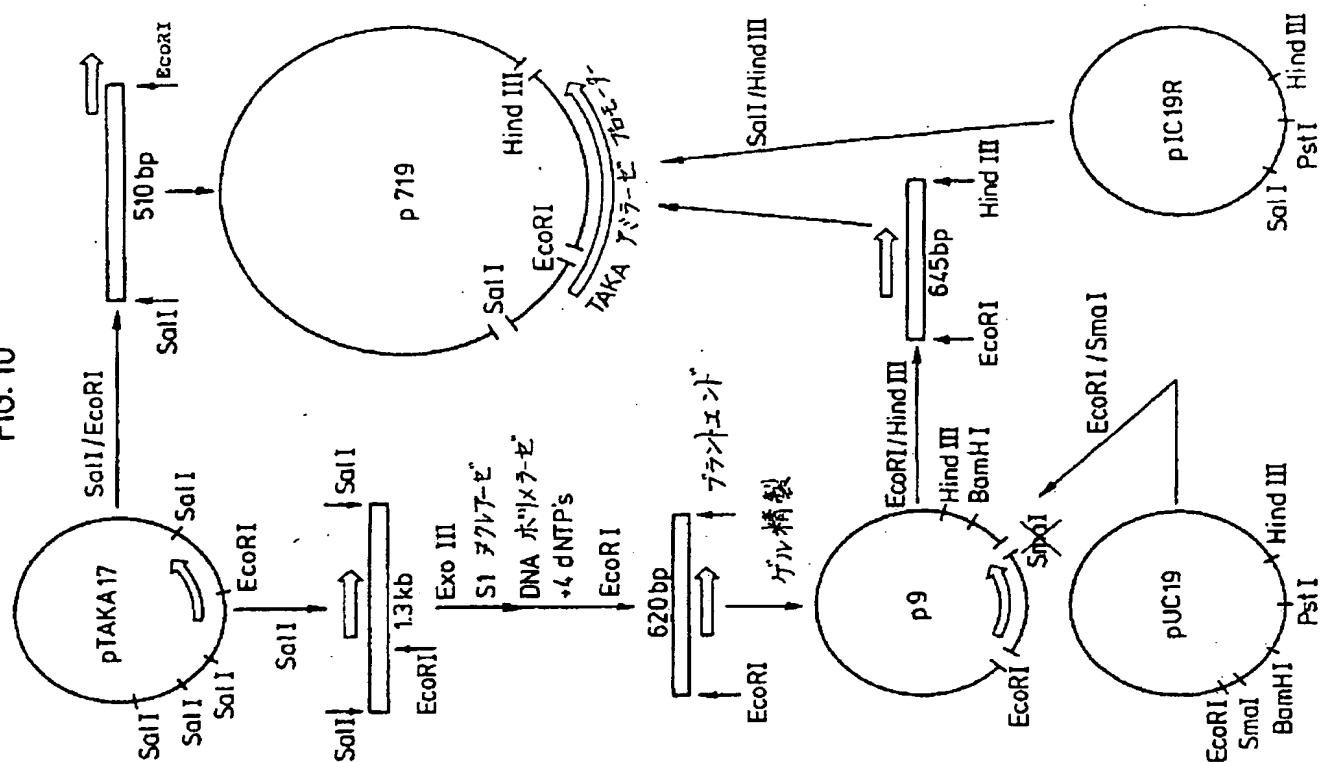


FIG. 11

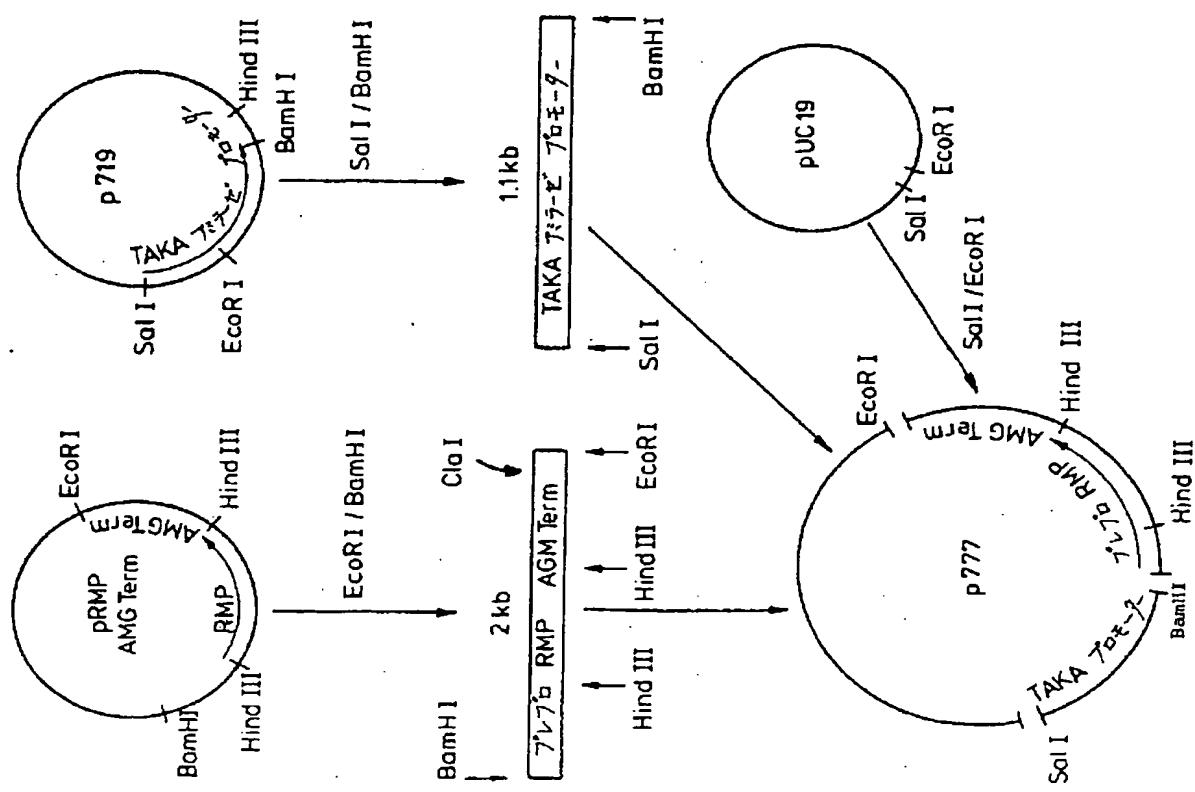


FIG. 13B

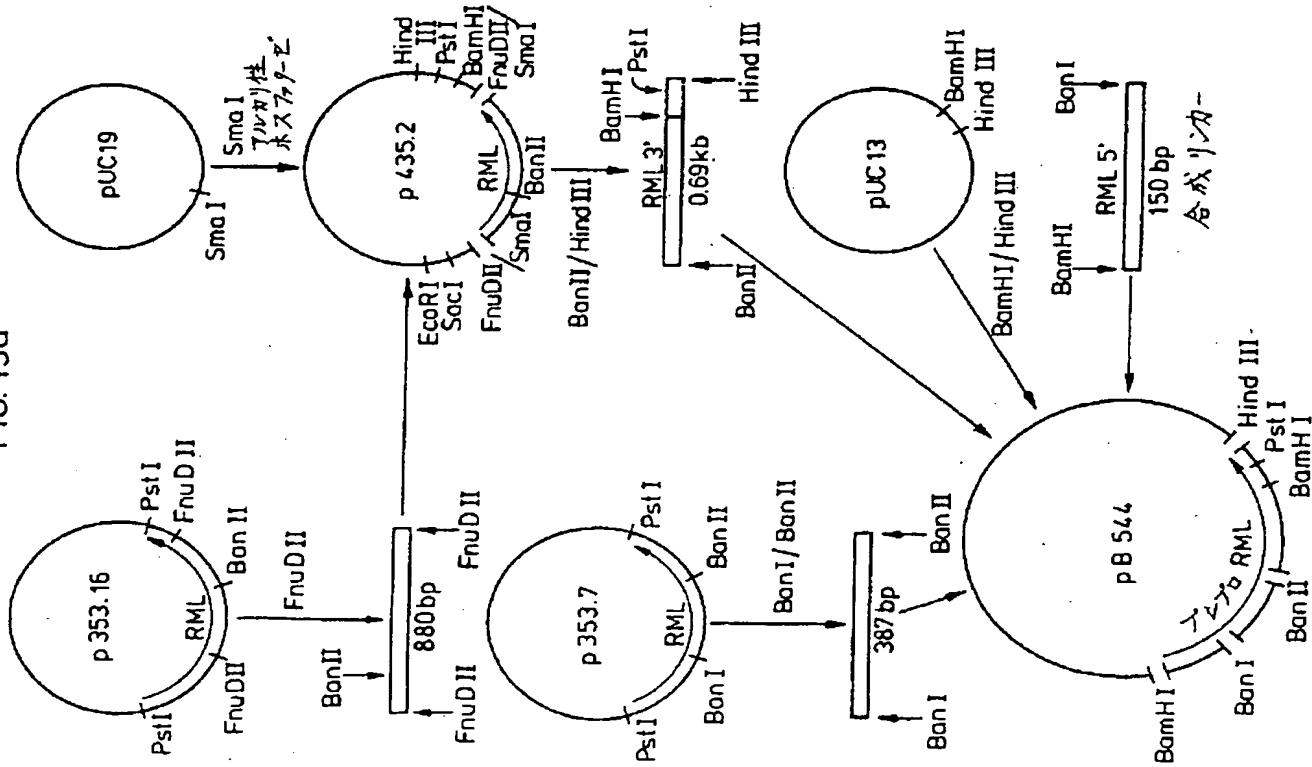


FIG. 12

FIG. 13b

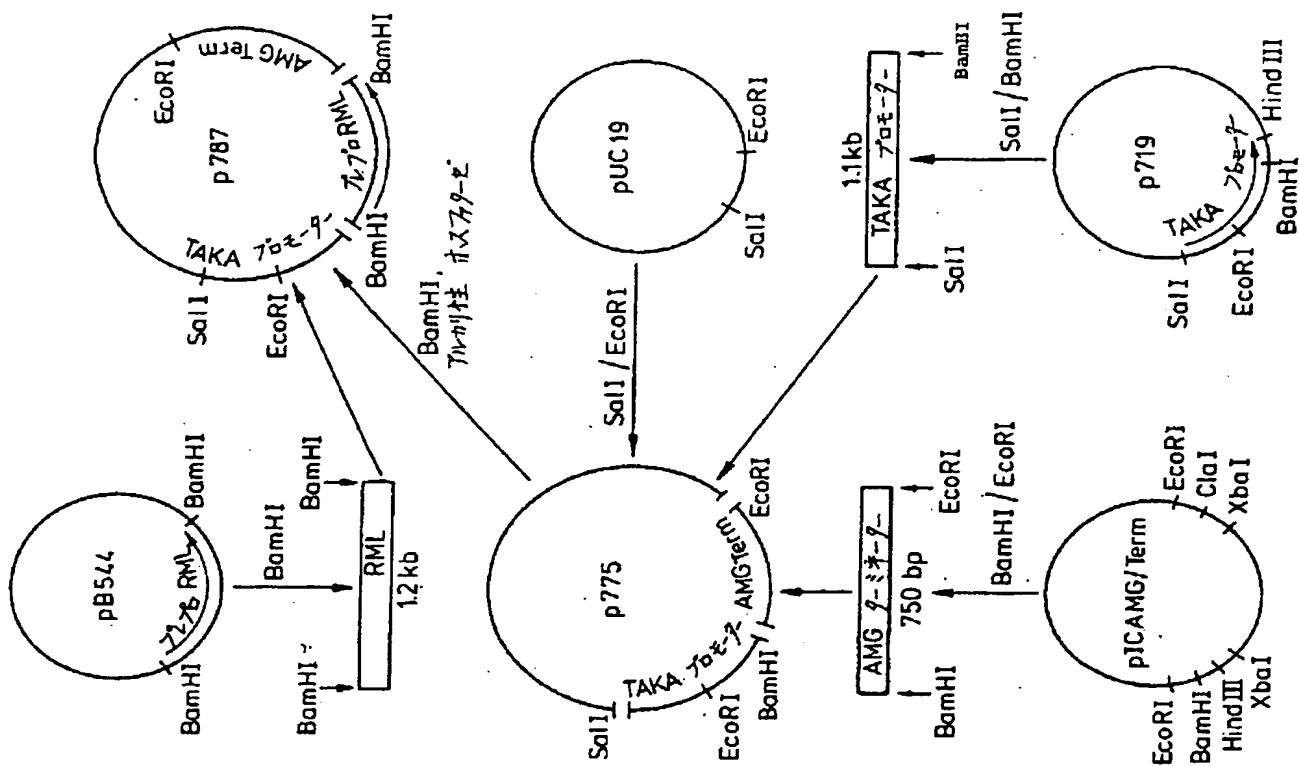


FIG. 14

アミノ酸配列

BamHI
 Met Val Leu Lys Gln Arg Ala Asn
 GAT C C A C C A T G G T A C T T A A G C A G C G C A A A C
 G T G G T A C C A T G A A T T C G T C G G G C G T T T G
 NcoI
 BssHII

Tyr Leu Gly Phe Leu Ile Val Phe Phe Thr Ala
 T A C C T A G G C A T T T C T G A T T G T A T T C T T C A C G G C C
 A T G G A T C C T A A A G A C T A A C T A A G A G T G C C G G
 AvrII

Phe Leu Val Glu Ala Val Pro Ile Lys Arg Gln
 T T C C T G G T G G A A G C G G T A C C C A T C A A G A C C A A
 A A G G A C C A C C T T C G C C A T G G G T A G T T C T C T G T T
 KpnI

Ser Asn Ser Thr Val Asp Ser Leu Pro Pro Leu
 T C G G A A T T C C A C C C T G G A C A G T C T G C C C T C
 A G C T T A A G C T G C C A G C T G C A G A C G G C G G A C A G
 EcoRI SalI

Ile Pro Ser Arg Thr Ser Ala
 A T C C C C T C G A G A A C C T C G
 T A G G G G A G C T C T T G G A G C C C G T C
 XbaI BamI

FIG. 15b

AATCCAGCTGCCGCCGGAGATCACCAAG
GGTCGACGGCCGGCTCTAGTGGCTAG
(合成オリゴ)

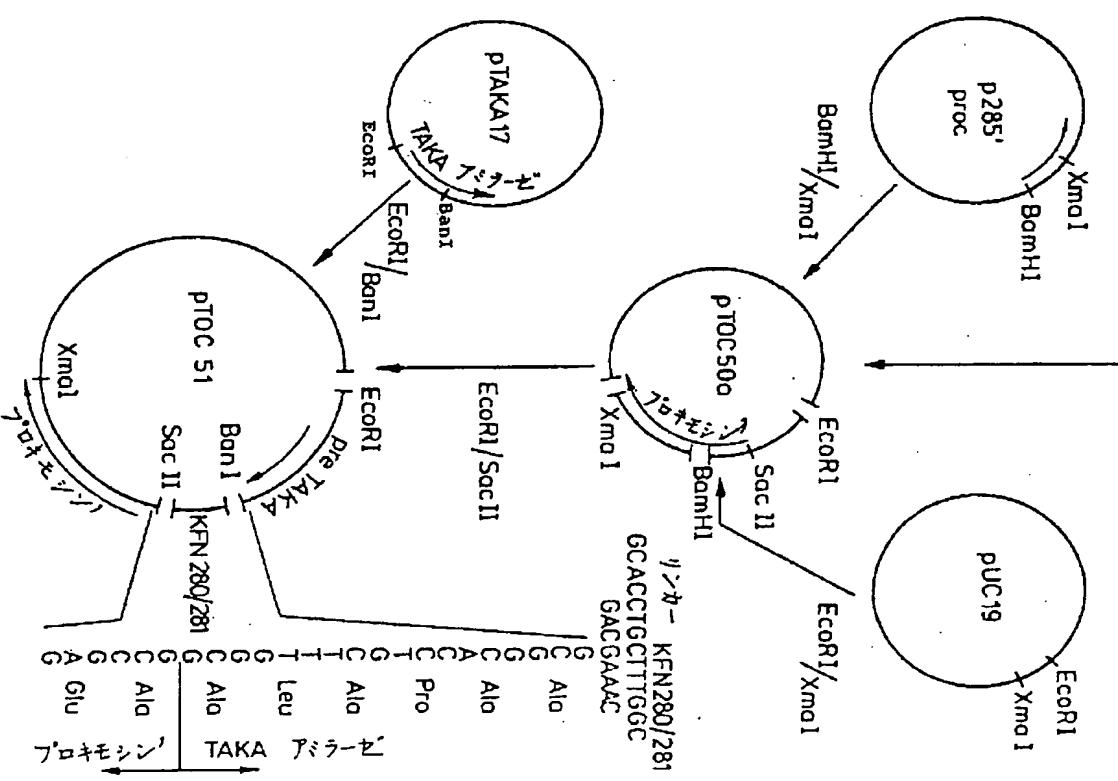
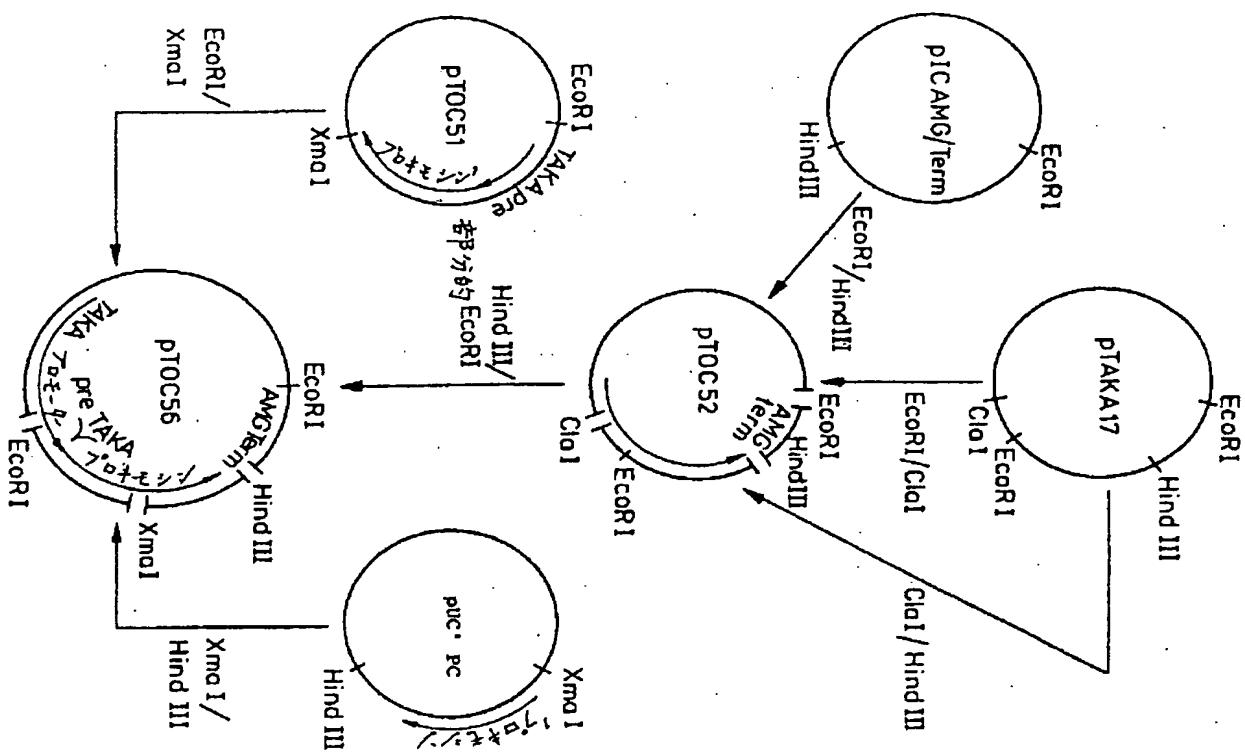


FIG. 15a

特開昭62-272988 (32)



手 続 换 正 書 (方式)

昭和62年5月11日

特許庁長官 黒田 明 基 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第60276号

2. 発明の名称

アスペルギルス オリザにおけるタンパク生成物
の製造法

3. 换正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ノボ インダストリ アクティーゼルスカブ

4. 代 理 人

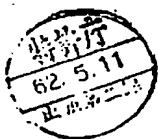
住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青木 朗
(外4名)

5. 换正命令の日付

自 発 换 正



6. 换正の対象

- (1) 明細書
- (2) 原寄託についての受託証の写

7. 换正の内容

- (1) 明細書の添付 (内容に変更なし)
- (2) 別紙の通り

8. 添付書類の目録

- (1) 添付書類の目録 1通
- (2) 原寄託についての受託証
の写及び訳文 各1通

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.